



Luís Pedro Serra Pinheiro

Licenciado em Bioquímica

Estratégia biomimética para a síntese de um núcleo aminopirrolidinil carboxamidina

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Paula Branco, Professora Auxiliar com Agregação, FCT/UNL

Co-orientadores: Ana Lourenço, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor António Jorge Dias Parola,
Professor Associado com Agregação,
Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Professora Doutora Maria Manuela Marques
Araújo Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade
de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova
de Lisboa

Vogais: Professora Doutora Paula Cristina de Sêrio
Branco, Professora Auxiliar com Agregação,
Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Outubro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Luís Pedro Serra Pinheiro

Licenciado em Bioquímica

**Estratégia biomimética para a síntese de um núcleo
aminopirrolidinil carboxamidina**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Paula Branco, Professora Auxiliar com Agregação, FCT/UNL

Co-orientadores: Ana Lourenço, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Professor Doutor António Jorge Dias Parola,
Professor Associado com Agregação,
Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Professora Doutora Maria Manuela Marques
Araújo Pereira, Professora Auxiliar, Faculdade
de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova
de Lisboa

Vogais: Professora Doutora Paula Cristina de Sério
Branco, Professora Auxiliar com Agregação,
Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Outubro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis *in* “Odes”, 1933

“I have not failed. I’ve just found 10,000 ways that won’t work.”

Thomas Edison

Estratégia biomimética para a síntese de um núcleo aminopirrolidinil carboxamidina

Copyright © Luís Pedro Serra Pinheiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero, em primeiro lugar, fazer um agradecimento especial à minha orientadora, a professora Paula Branco, por me ter aceite neste projeto e ter depositado em mim a sua confiança e a responsabilidade de contribuir para o progresso desta investigação. Tenho de destacar todo o apoio que me deu, estando sempre presente e dizer-lhe que fico muito contente por ter escolhido este projeto e à professora como orientadora, pois de todas as vezes que reuníamos a professora escutava-me e tinha em consideração a minha opinião e inclusive incentivava-me a fazer mais e melhor. Por tudo isto, obrigado professora. Não posso terminar este agradecimento sem o dirigir também às professoras Ana Lourenço e Luísa Ferreira, que também me acompanharam ao longo deste ano.

A todos os colegas dos laboratórios 202 e 205, pelo ambiente de trabalho fantástico e por poder contar com eles e com a sua experiência no laboratório. Em especial ao João Macara, à Sofia Santos, à Margarida Martins e ao Diogo Poeira que foram os melhores colegas de laboratório que podia ter. Obrigado pelos tantos e bons momentos passados. À Gabriela Malta, porque na sua companhia não havia colunas RP-18 aborrecidas. À Juliana, com quem partilhei muitas opiniões. Ao Rafael Rippel, que me acompanhou no meu projeto e por poder contar com a sua experiência e conselhos. À Patrícia Máximo, porque todos os dias começam com um “Bom dia!” e os dela são os melhores.

À Dr^a Ana Teresa Lopes e à Dr^a Luz Fernandes pelos serviços prestados.

À “Turma” que me acompanha desde o primeiro ano, em especial à Margarida e à Mariana pelas melhores horas de almoço, por me ouvirem e incentivarem e estarem lá nos bons e nos maus momentos. Obrigado por terem tornado este ano num dos melhores anos de faculdade!

A todos os meus amigos que ao longo deste ano fizeram de alguma forma parte do meu percurso.

Em último, quero agradecer à minha família e sobretudo aos meus pais pelo apoio incondicional. Obrigado por demonstrarem o prazer e o orgulho que sentiam quando me ouviam a explicar o projeto e pelo esforço em compreendê-lo.

Resumo

A cernumidina é um produto natural presente na planta *Solanum cernuum* Vell. Biologicamente, tem atividade inibitória da produção de interleuquina-8 nas células HT-29 do carcinoma do cólon. Quimicamente, a cernumidina é uma condensação entre o ácido isoferúlico e um núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina, cuja síntese não se encontra reportada na literatura.

Nesta tese, planeou-se uma síntese para a cernumidina e análogos que tem como material de partida a L-arginina. Iniciou-se pela derivatização da L-arginina na posição N^α , formando uma amida. De seguida, faz-se a descarboxilação oxidativa do derivado. Este passo é crucial uma vez que resulta na formação de um ião acilimínio que é capturado intramolecularmente pela guanidina, formando o núcleo carboxamidina.

A derivatização da L-arginina com um ácido passou pela adição direta do cloreto de ácido respetivo, ativação do ácido formando um cloreto de ácido ou com recurso a reagentes de acoplamento. Os melhores rendimentos foram obtidos no método de ativação do ácido através da formação do respetivo cloreto de ácido.

A descarboxilação oxidativa dos derivados com diacetoxiidobenzeno/ I_2 provou ser muito pouco eficiente uma vez que os rendimentos obtidos foram baixos, exceto quando o solvente usado foi DCM/AcOH 1:3 (59%). A descarboxilação oxidativa com $AgNO_3/(NH_4)_2S_2O_8$ e $CuSO_4$ permitiu obter bons rendimentos. Contudo, este método é limitado apenas a substratos benzoíladados, sendo que só se obtiveram dois produtos. A adição antecipada do Cu(II) ao derivado e só depois do par $AgNO_3/(NH_4)_2S_2O_8$ mostrou-se relevante para a eficácia da reação.

As tentativas de se obter preferencialmente um dos enantiómeros do produto pela adição de ligando quirais na reação de descarboxilação oxidativa foram fracassadas uma vez que estes foram destruídos pelas fortes condições oxidantes da reação. A formação de sais diaestereoisoméricos e uso de sais de itérbio e európio para a resolução da mistura também não produziram resultados positivos.

Palavras chave: cernumidina; carboxamidina; L-arginina; descarboxilação oxidativa; acilimínio; Ag(II); peroxidissulfato.

Abstract

Cernumidine is a natural product present in the plant *Solanum cernuum* Vell. Biologically, it has inhibitory activity in the production of interleukine-8 in the HT-29 colon carcinoma cells. Chemically, cernumidine is a condensation between isoferulic acid and a 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidine core, whose synthesis is not yet reported in literature.

In this thesis, a synthesis for cernumidine was planned, starting from *L*-arginine. It starts by derivatizing arginine at the N^α , giving an amide. Next, an oxidative decarboxylation of the derivative takes place. This is a crucial step since it generates an acyliminium ion which is trapped intramolecularly by guanidine, giving the carboxamidine core.

The derivatization of *L*-arginine was achieved by direct addition of the acyl chloride, activation of the acid to obtain the respective acyl chloride or reacting the acid with coupling reagents. The best yields were obtained when the activation of the acid through acyl chloride formation was employed.

The oxidative decarboxylation of the arginine derivatives with diacetoxyiodobenzene/ I_2 proved to be inefficient since the yields obtained were low, except when the solvent used was DCM/AcOH (1:3) (59%). The oxidative decarboxylation with $AgNO_3/(NH_4)_2S_2O_8$ and $CuSO_4$ gave the product in good yields. However, this method is limited to only benzoylated substrates, given only two products were obtained. The addition of Cu(II) to the derivative prior to $AgNO_3/(NH_4)_2S_2O_8$ showed to be relevant for the reaction's efficiency.

Attempts to obtain predominantly one of the enantiomers of the product by adding chiral ligands to the oxidative decarboxylation reaction were unsuccessful since these were destroyed by the strongly oxidant conditions of the reaction. The formation of diastereoisomeric salts and the use of ytterbium and europium salts for the resolution of the mixture also were unsuccessful.

Keywords: cernumidine; carboxamidine; *L*-arginine; oxidative decarboxylation; acyliminium; Ag(II); peroxydisulfate.

Índice de conteúdos

I.	Introdução.....	1
I.1.	Produtos Naturais e o desenvolvimento de fármacos.....	3
I.2.	Abordagens sintéticas à formação do núcleo amino-pirrolidina	7
I.3.	L-arginina	9
I.4.	A formação de amidas.....	10
I.5.	Descarboxilação oxidativa de aminoácidos	14
II.	Discussão de resultados.....	21
II.1.	Preâmbulo	23
II.2.	Reação de N^α-derivatização de L-arginina.....	24
II.3.	Reações de descarboxilação oxidativa com DIB/I₂	40
II.4.	Reações de descarboxilação oxidativa com NBS	46
II.5.	Reações de descarboxilação oxidativa com AgNO₃/(NH₄)₂S₂O₈ e CuSO₄	50
II.6.	Reações de descarboxilação oxidativa com AgNO₃/(NH₄)₂S₂O₈, CuSO₄ e ligandos quirais.....	62
II.7.	Separação dos enantiómeros do produto final.....	63
III.	Conclusões e perspectivas futuras	65
IV.	Parte experimental	71
IV.1.	Preâmbulo	73
IV.2.	Síntese de N^α derivados de L-arginina.....	75
IV.2.1.	Através de reação com cloretos de ácido.....	75
IV.2.1.1.	Procedimento geral.....	75
IV.2.1.2.	Síntese de N^α -benzoíl-L-arginina (2a).....	76
IV.2.1.3.	Síntese de N^α -(<i>E</i>)-(3-fenil)acrilóíl)-L-arginina (2c)	76
IV.2.1.4.	Síntese de N^α -(3-fenilpropanil)-L-arginina (2e)	77
IV.2.1.5.	Síntese de N^α -fenilacetil-L-arginina (3f)	78
IV.2.1.6.	Síntese de N^α -fenoxicarbonil-L-arginina (2g)	78
IV.2.1.7.	Síntese de (<i>S</i>)-1-(9-fluorenilmetoxicarbonil)prolil-L-arginina (3h).....	79
IV.2.2.	Através de reagentes de acoplamento.....	80
IV.2.2.1.	Procedimento geral.....	80
IV.2.2.2.	Síntese de N^α - <i>p</i> -metoxibenzoíl-L-arginina (2b)	80
IV.2.2.3.	Síntese de N^α -(<i>E</i>)-(3-fenil)acrilóíl)-L-arginina (2c)	81
IV.2.2.4.	Síntese de N^α -(<i>E</i>)-(3-(<i>p</i> -metoxifenil)acrilóíl)-L-arginina (2d)	81
IV.2.2.5.	Síntese de (<i>S</i>)-1-(9-fluorenilmetoxicarbonil)prolil-L-arginina (2h).....	82
IV.2.2.6.	Síntese de (<i>S</i>)-2-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)histidinil-L-arginina (2i).....	83

IV.3. Reações de descarboxilação oxidativa	84
IV.3.1. Com o par DIB/I₂.....	84
IV.3.1.1. Procedimento geral.....	84
IV.3.1.2. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (2a).....	84
IV.3.1.3. Síntese de (<i>E</i>)- <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-(3-fenil)acrilamida (3c).....	84
IV.3.1.4. Síntese de fenil (1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)carbamato (3g).....	85
IV.3.2. Com o par AgNO₃/(NH₄)₂S₂O₈ e CuSO₄	86
IV.3.2.1. Procedimento geral.....	86
IV.3.2.2. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (3a).....	86
IV.3.2.3. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-4-metoxibenzamida (3b)....	86
IV.3.2.4. Síntese de (<i>E</i>)- <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-(3-fenil)acrilamida (3c) ..	87
IV.3.2.5. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-fenilpropanamida (3e)	87
IV.3.2.6. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-2-fenilacetamida (3f)	87
IV.3.2.7. Síntese de <i>terc</i> -butil ((2 <i>S</i>)-1-((1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)amino)-3-(1 <i>H</i> -imidazol-5-il)-1-oxopropan-2-il)carbamato (3i)	88
IV.3.3. Com AgNO₃/(NH₄)₂S₂O₈²⁻/CuSO₄ e ligandos quirais.....	89
IV.3.3.1. Procedimento geral.....	89
IV.3.3.2. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (3a).....	89
IV.3.4. Com picolinato de prata (II).....	91
IV.3.4.1. Síntese do picolinato de prata (II)	91
IV.3.4.2. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (3a).....	91
IV.3.5. Com <i>N</i>-Bromosuccinimida (NBS).....	92
IV.3.5.1. Procedimento geral.....	92
IV.3.5.2. Síntese de <i>N</i> -(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (3a).....	92
V. Referências.....	93
VI. Anexos	101

Índice de Figuras

Figura 1.1 Número de fármacos “moléculas pequenas” aprovados por ano de 1981 a 2014.	4
Figura 1.2 Estruturas da cernumidina e isocernumidina.	6
Figura 1.3 Via metabólica para a síntese da cernumidina, proposta por Lopes et al.	7
Figura 1.4 Síntese biológica do núcleo 2-hidroxi-pirrolidin-1-il carboxamida proposta por Ascenzi et al.	7
Figura 1.5 Reação de descarboxilação oxidativa desenvolvida por Boto et al.	8
Figura 1.6 Síntese biomimética para a síntese do núcleo geral das cambrescinas a partir da L-arginina.....	8
Figura 1.7 Estruturas de alguns derivados de aminoácidos.....	9
Figura 1.8 Mecanismo de conversão de um ácido carboxílico num cloreto de acilo com SOCl_2	10
Figura 1.9 Mecanismo de acilação de amida com cloreto de acilo.	10
Figura 1.10 Estruturas das carbodiimidas DCC, DIC e EDC em cima. Ao centro, mecanismo da reação de formação de amida com DCC (R^2 =ciclohexil). Pode também ser usado um aditivo após a formação da O-acilureia, o NHS por exemplo. O mecanismo para os derivados do benzotriazole são semelhantes. Em baixo, estruturas do HOBt e HOAt, que podem ser utilizados com a mesma função da NHS.	11
Figura 1.11 Mecanismo da reação de ativação do ácido carboxílico com CDI e formação de amida.	12
Figura 1.12 Descarboxilação oxidativa de L-arginina nos sistemas biológicos.....	14
Figura 1.13 Trabalho desenvolvido por Boto et al. As reações foram feitas com 2 eq de DIB e 0,5 eq de I_2 . Os melhores resultados foram obtidos tendo diclorometano ou acetonitrilo como solvente. a) Reações com L-prolina. b) Reação com L-ornitina em que ocorreu ciclização intramolecular. c) Reação com ácido L-glutâmico em que ocorreu ciclização intramolecular...	15
Figura 1.14 Mecanismo de descarboxilação oxidativa proposto por Akamanchi et al.	16
Figura 1.15 Catalisador de peroxotungstato desenvolvido e utilizado por Claes e colaboradores.	16
Figura 1.16 Mecanismo proposto para a descarboxilação oxidativa por Claes et al.....	16
Figura 1.17 Esquema da descarboxilação oxidativa de aminoácidos com OBr^- gerado eletroquimicamente para a obtenção dos nitrilos correspondentes.	17
Figura 1.18 Mecanismo de descarboxilação oxidativa de ácidos carboxílicos alifáticos por $\text{Ag(I)}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, proposta por Anderson e Kochi.....	18
Figura 1.19 Mecanismos de descarboxilação oxidativa com Ag(pic)_2 e $\text{Ag(I)}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, respetivamente, propostos por Silverman e Zelechonok.....	18
Figura 1.20 Mecanismo proposto por Huang et al.	19

Figura 2.1 Plano de síntese biomimética para o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina e para a cernumidina.	23
Figura 2.2 Espectro de ^1H RMN de N^α -Benzoil-L-arginina (2a) em D_2O	27
Figura 2.3 Espectro ^1H RMN de N^α -p-metoxibenzoil-L-arginina (2b) em D_2O	28
Figura 2.4 Espectro de ^1H RMN do produto N^α -(E)-(3-fenil)acrilóil-L-arginina (2c), em CD_3OD	29
Figura 2.5 Mecanismo de formação de cloreto de ácido através de reação com cloreto de tionilo com catálise de DMF.	31
Figura 2.6 Espectro ^1H RMN do composto N^α -(3-fenilpropanil)-L-arginina (2e), em D_2O	34
Figura 2.7 Espectro de ^1H RMN de N^α -(E)-(3-(p-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (2d), em CD_3OD	34
Figura 2.8 Espectro de ^1H RMN do composto N^α -fenilacetil-L-arginina (2f), em D_2O	35
Figura 2.9 Espectro ^1H NMR do composto N^α -fenoxicarbonil-L-arginina (2g), em CD_3OD	36
Figura 2.10 Mecanismo de remoção do grupo Fmoc com piperidina. No processo formam-se CO_2 , o aminoácido livre, representado por NH_2R , e dibenzofulveno.	37
Figura 2.11 Espectro ^1H RMN do dipéptido desprotegido (S)-prolil-L-arginina (2h), misturado com dibenzofulveno, em CD_3OD	38
Figura 2.12 Espectro ^1H RMN do composto (S)-2-(terc-butoxicarbonil)histidil-L-arginina (2i), em D_2O	39
Figura 2.13 Descarboxilação oxidativa do derivado de L-arginina (2) com DIB/I_2 e ciclização intramolecular, formando o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina e o respetivo produto (3).	40
Figura 2.14 Espectro de ^1H RMN, em D_2O , da mistura obtida na Entrada 5, composta por N^α -benzoil-L-arginina (2a) e N-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (3a). Os picos assinalados e os multipletos correspondem a (3a).	42
Figura 2.15 Espectro ^1H RMN do composto fenil (1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)carbamato (3g), em D_2O	43
Figura 2.16 Reprodução do mecanismo proposto para a reação de descarboxilação oxidativa com DIB/I_2 proposta por Minakata et al.	44
Figura 2.17 Reprodução do mecanismo proposto por Minakata et al. para a reação com o DIB, tendo como solvente uma mistura de DCM/AcOH	45
Figura 2.18 Síntese alternativa para obtenção do composto (3), começando pela descarboxilação oxidativa de L-arginina e reação posterior com cloretos de acilo.	46
Figura 2.19 Espectro ^1H RMN, em D_2O , dos compostos obtidos na entrada 2.	47

Figura 2.20 Mecanismo proposto por Gopalakrishnan e Hogg para a descarboxilação de aminoácidos com NBS.	48
Figura 2.21 Produtos obtidos na reação de descarboxilação oxidativa de (2a). A imida (5a) coeluiu com o produto (3a). O aldeído (6a) e a amida (7a) são os produtos de hidrólise e clivagem oxidativa do intermediário acilimínio.	52
Figura 2.22 Em cima, espectro ¹ H RMN, em D ₂ O, da mistura entre o produto (3b) e da imida (5b). Em baixo, estruturas destes dois compostos, respetivamente.	54
Figura 2.23 Espectro ¹ H RMN, em D ₂ O, de uma fração recolhida da TLC preparativa onde se pensa estar o produto (3e).	57
Figura 2.24 Espectro de ¹ H RMN, em D ₂ O, da mistura obtida entre o reagente de partida (2i) e o produto ciclizado (3i).	58
Figura 2.25 Reações laterais possíveis de ocorrer com o radical alquilo formado, após libertação de CO ₂	59
Figura 2.26 Reações laterais possíveis de ocorrer com o ião acilimínio no caso dos derivados (2c), (2e) e (2f).	60
Figura 2.27 Possíveis complexos com cobre (II) do derivado (2), à esquerda, e do ião acilimínio, à direita, promovendo a aproximação entre o nucleófilo e o eletrófilo.	61
Figura 2.28 Sais do produto (3a) com ácido L-tartárico (à direita) e com o reagente derivado (2a) (à esquerda).	63
 Figura 3.1 Síntese alternativa para a obtenção dos produtos (3).	68
 Figura A1 Espectro LC-MS da mistura de compostos obtida na reação de descarboxilação de L-arginina (1) com NBS.	101

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Reagentes de derivatização, respectivos produtos, melhores rendimentos obtidos nas reações de derivatização de L-arginina e o processo (cloreto de ácido ou reagente de acoplamento) com que se obteve esse rendimento.	25
Tabela 2.2 Síntese das condições usadas nas reações para a obtenção de (2c) , através da formação do cloreto de ácido	29
Tabela 2.3 Síntese dos métodos para a obtenção de (2c)	30
Tabela 2.4 Resumo dos vários ensaios para a obtenção de (3a)	41
Tabela 2.5 Síntese dos ensaios realizados para a obtenção de (3a) , tendo NBS como oxidante.	46
Tabela 2.6 Síntese dos métodos usados para a obtenção de (3a)	51
Tabela 2.7 Síntese dos ensaios para a obtenção de (3b)	52
Tabela 2.8 Síntese dos ensaios usados para a obtenção de (3c)	53
Tabela 2.9 Síntese dos ensaios para a obtenção de (3e)	56

Lista de abreviaturas

^{13}C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
^1H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de próton
AcOH	Ácido acético
Ag(pic) ₂	Picolinato de prata (II)
AIB	Ácido <i>o</i> -iodoxibenzóico
ATR	Reflexão Total Atenuada
B	Base
BINAP	(±)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftaleno
BINOL	(+)-1,1'-bi-2-naftol
Boc	<i>Terc</i> -butoxicarbonil
Cbz	Benziloxicarbonilo
CDI	1,1'-carbonildiimidazole
CoA	Coenzima A
d	Dupleto
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DCU	diciclohexilureia
dd	Dupleto de dupletos
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMAP	4-dimetilaminopirrolidina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization – Mass Spectrometry</i>
Fmoc	9-fluorenometoxicarbonil
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red</i>
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hidroxi-1H-benzotriazole
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
IL-8	Interleuquina-8
IV	Infravermelho
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
m	Multipeto
m/z	Razão massa/carga

MeOH	Metanol
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetil-benzenosulfonilo
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
p.f.	Ponto de fusão
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singuleto
<i>SPPS</i>	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
t	Tripleto
<i>t</i> -Bu	<i>Terc</i> -Butil
<i>TLC</i>	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
δ	Desvio químico
ν	Número de onda (cm ⁻¹)

I. Introdução

I. Introdução

I.1. Produtos Naturais e o desenvolvimento de fármacos

As plantas e produtos derivados são usados, desde os primórdios da humanidade, como meio de tratamento para as mais variadas enfermidades que afetam a espécie humana. Por volta do início do século XX, com os avanços da ciência, surgiu a ideia de que os efeitos fisiológicos dos extratos das plantas eram o resultado de interações específicas de moléculas que compunham os extratos com os alvos biológicos. Isto levou a que se procurasse isolar e identificar esses compostos e produzi-los sinteticamente em vez de utilizar o extrato.¹⁻³ Temos o exemplo dos alcaloides *Cinchona* em que o extrato da planta era utilizado pelos antigos para curar a malária e só mais tarde se descobriu que a molécula responsável por esse efeito era a quinina.⁴ Outro exemplo é a descoberta da penicilina e do seu poder antibiótico, que suscitou o interesse pelas beta-lactamas e, por outro lado, levou a um aumento da investigação dos microrganismos na procura de compostos com potencial interesse biológico.³

Os produtos naturais têm enorme relevância para a indústria farmacêutica, sendo uma importante fonte de estruturas moleculares que podem ser fármacos por si só ou servir de base para a síntese de novos fármacos. Além do mais, a complexidade intrínseca dos organismos permite a descoberta e obtenção de produtos naturais química e estruturalmente singulares e complexos, que são muito difíceis, senão mesmo impossíveis, de obter de forma estritamente sintética. É o caso do paclitaxel.^{2,5}

Newman e Cragg, no seu artigo de revisão de 2016, fazem uma análise detalhada da relevância dos produtos naturais na origem de novos fármacos no período de 1984 a 2014. Cerca de um terço de todos os fármacos aprovados classificados como “moléculas pequenas”, neste período, são produtos naturais, derivados de produtos naturais ou sintéticos mas com um farmacóforo natural. Em 2014, 11 (25%) das 44 moléculas pequenas aprovadas como fármacos inserem-se nas categorias referidas (Figura 1.1).⁶

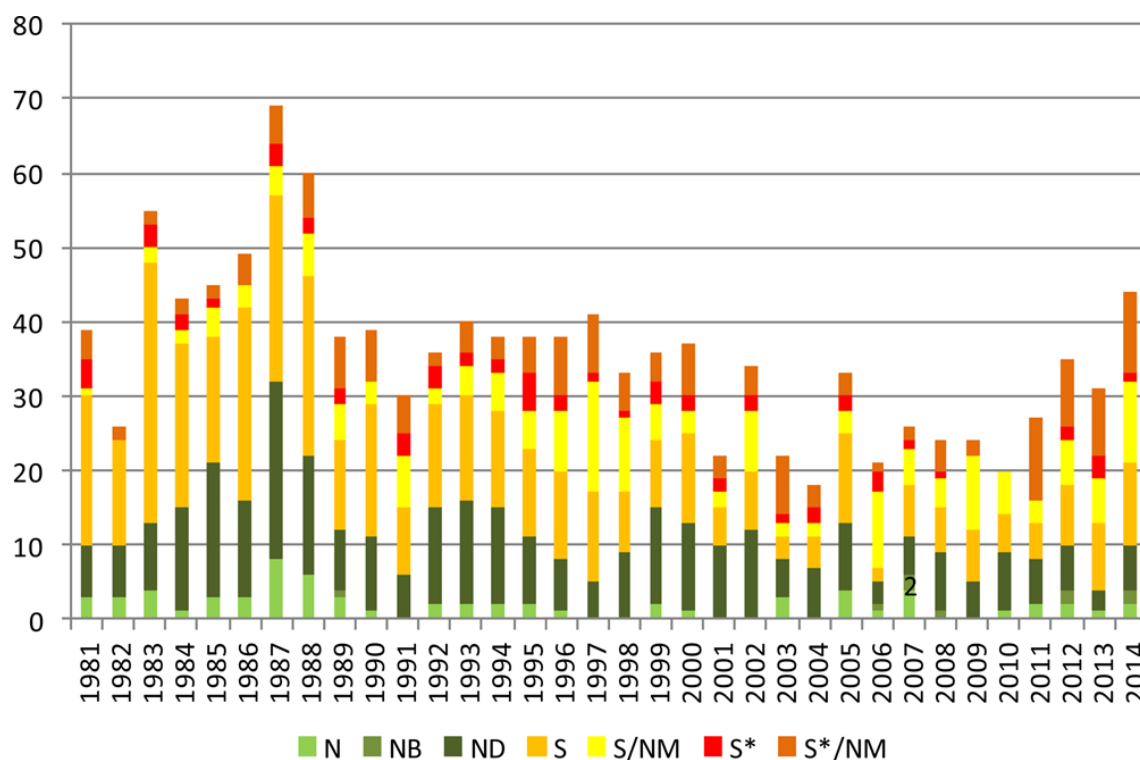


Figura 1.1 Número de fármacos “moléculas pequenas” aprovados por ano de 1981 a 2014. “N” são produtos naturais inalterados; “NB” são “fármacos botânicos”, isto é, são um conjunto de moléculas que atuam sinergicamente como se se tratasse do extrato natural da origem; “ND” são derivados de produtos naturais; “S” são fármacos totalmente sintéticos, sem uma origem natural; “S/NM” são sintéticos que mimetizam o ligando natural; “S*” são fármacos sintéticos mas com um farmacóforo natural; “S*/NM” são sintéticos com farmacóforo natural e mimetizam o ligando natural. Estas designações foram atribuídas pelos autores. A figura é uma reprodução do artigo de 2016 de Newman e Cragg “Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014”.⁶

Desde 1990, tem-se verificado um declínio no número de fármacos baseados em produtos naturais. Isto deve-se à preferência das indústrias farmacêuticas pelo *High-Throughput Screening* (HTS) de bibliotecas de compostos sintéticos em detrimento de derivados naturais, apesar destes terem uma taxa de sucesso superior no HTS (cerca de 0,3% contra <0,001% das bibliotecas de compostos sintéticos).⁷

Contudo, nos últimos anos parece existir um ressurgimento do interesse pela investigação dos produtos naturais na medida em que estes proporcionam estruturas tridimensionais únicas, como já foi referido. Também a integração de várias áreas de estudo como metabolómica, proteómica, genómica, química computacional e bioquímica podem permitir maior sucesso na descoberta de compostos farmacologicamente relevantes a partir de produtos naturais, dado que estes, obviamente, interagem naturalmente com proteínas, que constituem a maioria dos alvos biológicos.^{1,5,7,8}

Desta forma, as plantas e os produtos naturais têm, por um lado, um papel importante na indústria farmacêutica e na descoberta de novos fármacos, por outro, na medicina tradicional, nomeadamente em países em desenvolvimento onde o acesso às tecnologias médicas e farmacêuticas é mais limitado. As populações recorrem aos extratos de plantas a fim de encontrar a cura para as doenças. De facto, um estudo de Cragg *et al.*⁹ refere que aproximadamente 65%

da população mundial recorre às medicinas tradicionais à base de plantas como cuidado primário de saúde.

Uma dessas plantas é a *Solanum cernuum* Vell., usada na medicina tradicional do Brasil. É usada para tratamento de úlceras gástricas, lesões hepáticas, perturbações na pele, como agente anti-tumoral, depurativo, diurético, anti-hemorrágico e anti-blenorreico. Uma infusão das folhas também pode ser usada para tratar desordens do foro cardíaco, como arritmias.¹⁰ Um estudo mais recente mostrou que a planta tem também propriedades antioxidantes e anti-genotóxicas.¹¹ Em 2011, Lopes e colaboradores isolaram e caracterizaram dois compostos a partir do extrato hidroalcoólico (95% etanol) de folhas secas desta planta, a cernumidina e a isocernumidina (Figura 1.2).¹² Estas duas moléculas são isómeros estruturais na dupla ligação, sendo o isómero *E* a cernumidina e o isómero *Z* a isocernumidina. Estas moléculas possuem um núcleo 2-aminopirrolidin-1-il-carboxamidina (Figura 2 a vermelho) condensado com o isómero *E* ou *Z* do ácido 3-(3-hidroxi-4-metoxifenil) propenóico (isoferúlico). O fator que despertou o interesse nestas moléculas foi o núcleo carboxamidina cuja síntese não está reportada na literatura. Biologicamente, Lopes *et al.* estudaram os efeitos antibióticos, anti-neoplásicos e anti-inflamatórios das cernumidinas. Nos dois primeiros os resultados são negligíveis para os microrganismos e linhas celulares estudadas, respetivamente. No último, concluíram que a cernumidina (isómero *E*) é um inibidor da produção de interleuquina-8 (IL-8) nas células HT-29 do carcinoma do cólon.¹² A IL-8 é produzida naturalmente em vários tipos de células do organismo e a sua atividade está normalmente relacionada com quimiotaxia, angiogénese e o processo inflamatório mas também é produzida em certos tipos de cancros do sistema gastrointestinal, entre os quais o carcinoma do cólon. Brew *et al.*¹³ investigaram a função da IL-8 nas células HT-29 e obtiveram dados que apontam para atuação da IL-8 como um fator de crescimento autócrino destas células. Estudos mais recentes apontam também para uma relação entre a produção de IL-8 e o processo metastático e a sobrevivência celular.^{14,15} Todas estas informações conferem relevância não só sintética, como também biológica à cernumidina.

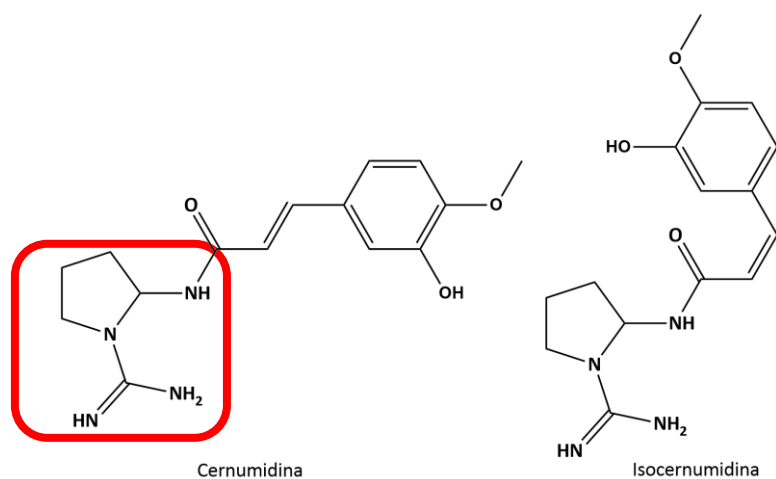


Figura 1.2 Estruturas da cernumidina e isocernumidina. O núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina está destacado a vermelho.

I.2. Abordagens sintéticas à formação do núcleo amino-pirrolidina

Lopes *et al.*¹² sugerem uma via biossintética (apesar de não consubstanciada em estudos) para a obtenção do núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina e, por conseguinte, ambas as cernumidinas. Neste, o aminoácido L-arginina é descarboxilado, originando agmatina. Depois, os autores sugerem uma oxidação da agmatina a 4-guanidilbutilimina, seguido da ciclização intramolecular que dá origem ao núcleo referido. Finalmente, este núcleo é estabilizado na amina da posição 2 com um tioéster do isômero *E* ou *Z* do ácido isoferúlico, na forma de (*E/Z*)-isoferuloil-CoA, que se sabe estar envolvido na síntese natural de amidas (Figura 1.3).

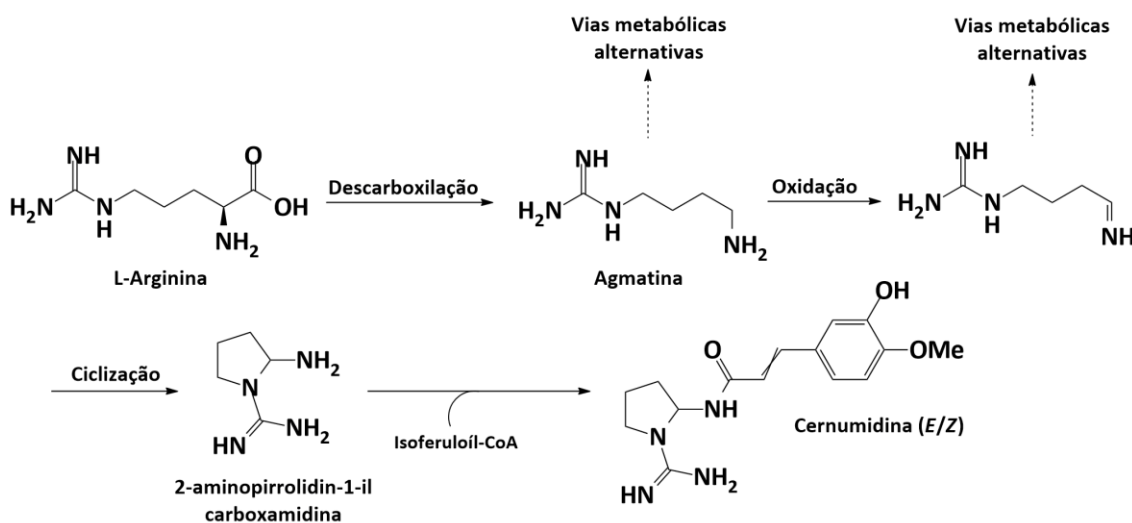


Figura 1.3 Via metabólica para a síntese da cernumidina, proposta por Lopes *et al.*¹²

Como já foi dito anteriormente, não foi até ao momento possível descortinar na literatura uma síntese para o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina (Figura 2 a vermelho). Contudo, existem processos descritos de sínteses para núcleos semelhantes. Ascenzi *et al.*¹⁶ reportam a síntese biológica do hemiaminal 2-hidroxopirrolidin-1-il carboxamidina a partir de agmatina recorrendo à aminoxidase contendo cobre de *Pisum sativum* L. num processo de desaminação oxidativa. Neste processo o 4-guanidinobutiraldeído resultante da desaminação cicliza intramolecularmente com o ataque da guanidina ao aldeído, dando origem ao produto hemiaminal (Figura 1.4).

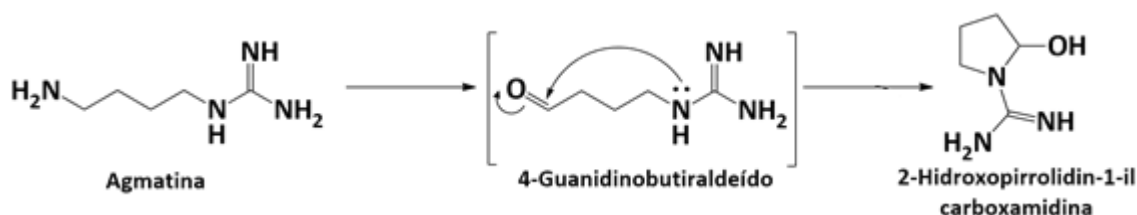
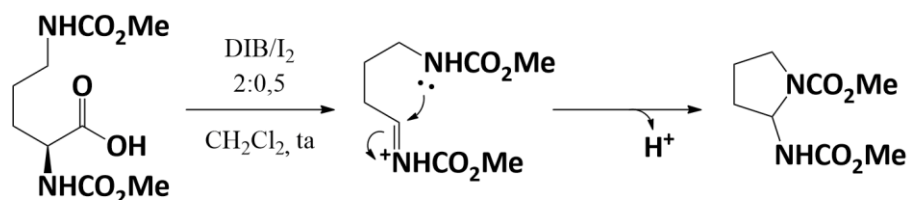


Figura 1.4 Síntese biológica do núcleo 2-hidroxopirrolidin-1-il carboxamidina proposta por Ascenzi *et al.*¹⁶ A agmatina sofre desaminação oxidativa pela aminoxidase contendo cobre e o aldeído resultante cicliza intramolecularmente.

Boto *et al.*¹⁷ desenvolveram um processo que visa a descarboxilação oxidativa de um derivado metilcarbamato da L-ornitina, seguido de ciclização intramolecular, originando um núcleo 2-aminopirrolidina derivatizado na forma de carbamato. Ocorre a formação de um intermediário acilímínio que é armadilhado numa reação intramolecular formando o produto cíclico (Figura 1.5).



L-ornitina derivatizada

Figura 1.5 Reação de descarboxilação oxidativa desenvolvida por Boto *et al.*¹⁷

Silva *et al.*¹⁸ em 2019 estudaram a via biossintética para a obtenção de cambrescinas, alcaloides naturais obtidos de esponjas marinhas. A partir daí, desenvolveram uma síntese biomimética que parte da L-arginina, por esta conter o grupo guanidina na sua estrutura. Por descarboxilação oxidativa e ciclização deste aminoácido obtêm *in situ* um ião pirrólio altamente reativo, que depois usam para obtenção de um núcleo 1-aminopirrólo[1,2-c]pirimidina (Figura 1.6).

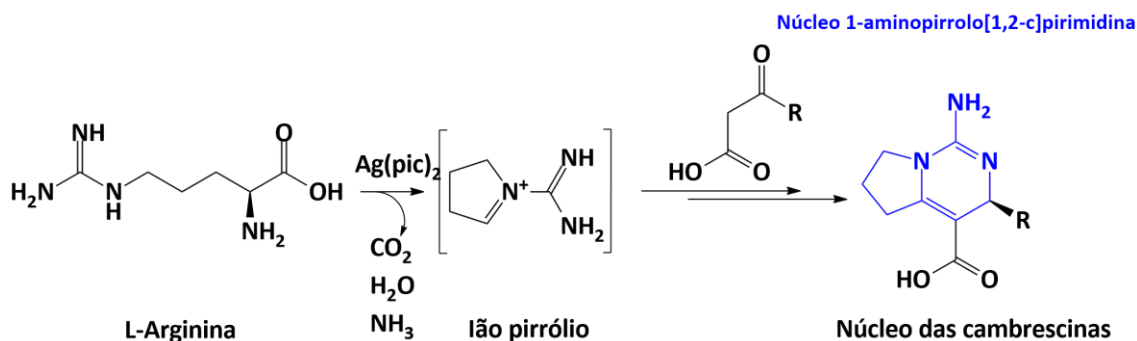


Figura 1.6 Síntese biomimética para a síntese do núcleo geral das cambrescinas a partir da L-arginina. A azul, núcleo 1-amino[1,2-c]pirimidina.¹⁸

Assim, nesta tese podemos destacar dois objetivos principais, o desenvolvimento de uma metodologia que permita a síntese do núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina e em segundo lugar a aplicação do método na síntese e caracterização da cernumidina e análogos. Para tal irá recorrer-se ao aminoácido L-arginina numa abordagem biomimética à formação da cernumidina.

I.3. L-arginina

A L-arginina (Arg ou R) é um aminoácido proteinogénico, classificado como aminoácido semi-essencial, o que significa que somos capazes de o sintetizar mas, para satisfazer as nossas necessidades fisiológicas, temos de o consumir na dieta. No corpo humano a L-arginina é um importante mediador do ciclo da ureia e é o substrato da enzima sintase do óxido nítrico, sendo que este último desempenha um papel na regulação da pressão arterial, na resposta imunológica e como relaxante muscular. Por estas razões, mas também por melhorar o desempenho físico e sexual, este aminoácido também ganhou bastante popularidade no mundo do fitness como suplemento. Estruturalmente, contém uma cadeia lateral com um grupo guanidina na posição δ ao ácido carboxílico, com um pKa de 13,8 que lhe confere um carácter muito básico.¹⁹⁻²²

A riqueza de grupos funcionais presentes nos L-aminoácidos e a presença inerente de centros assimétricos tornam-nos excelentes precursores de uma enorme variedade de moléculas, como por exemplo os neuropeptídeos e hormonas peptídicas, como a insulina, a vasopressina e a oxitocina²³ (Figura 1.7), o adoçante sintético L-aspartame²⁴ (Figura 1.7) e um sem número de outras moléculas, naturais ou sintéticas, provenientes das mais variadas fontes que podem ser usadas com diferentes fins, como é o exemplo do antiviral ritonavir⁶ que contém uma cadeia peptídica, das penicilinas²⁵ (Figura 1.7) que são a condensação entre dois aminoácidos, e também da cernumidina¹² (Figura 1.2). Santos *et al.*²⁶ referem alguns exemplos de dipéptidos e tripéptidos, de origem natural ou sintética, e a sua função no organismo. É o caso do dipéptido natural Ile-Tyr que reduz a pressão arterial²⁷.

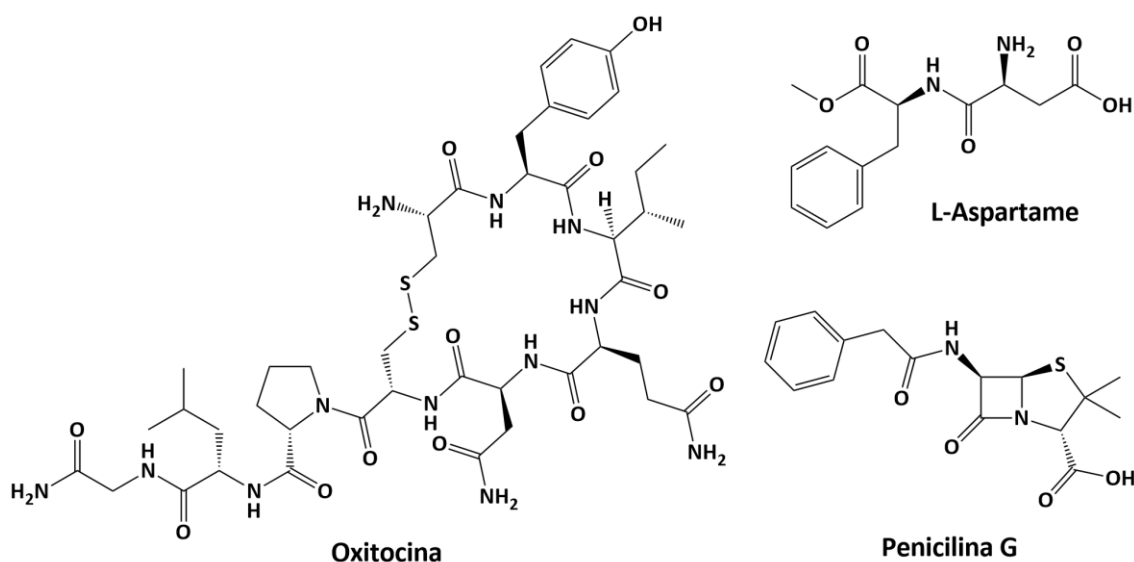


Figura 1.7 Estruturas de alguns derivados de aminoácidos.

I.4. A formação de amidas

Como já foi referido, a arginina forma ligações peptídicas com outros aminoácidos e como tal está presente nas proteínas. A ligação peptídica é uma amida que resulta da reação entre o grupo ácido carboxílico de um aminoácido com o grupo amina de outro. Naturalmente, a síntese de amidas ocorre com recurso a enzimas. Sinteticamente, os químicos têm de recorrer a métodos mais agressivos para conseguirem vencer a barreira termodinâmica associada à formação de amidas. Tradicionalmente, a síntese de amidas passa pela acilação de uma amina com um ácido carboxílico ativado, que também se aplica quando falamos de síntese de péptidos em fase sólida (*SPPS*), o método padrão para fazer péptidos.²⁸

Os ácidos carboxílicos são moléculas pouco reativas, muito estabilizadas pela conjugação entre os átomos de oxigénio e por terem um mau grupo de saída, o OH^- . Como tal, têm de ser convertidos em moléculas mais reativas. Estamos a falar dos cloretos de acilo, dos anidridos ou dos ésteres ativados.²⁹⁻³¹

A conversão de ácidos carboxílicos em cloretos de acilo faz-se usando cloreto de tionilo, SOCl_2 (Figura 1.8), pentacloreto de fósforo, PCl_5 , ou cloreto de oxaloílo, $(\text{COCl})_2$.³¹

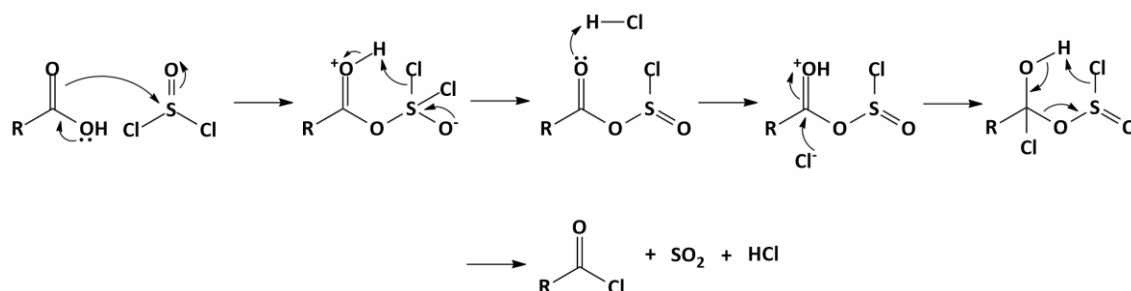


Figura 1.8 Mecanismo de conversão de um ácido carboxílico num cloreto de acilo com SOCl_2

A reação do cloreto de ácido com a amina necessita de uma base como sequestrador do HCl que se forma durante a reação para evitar a protonação da amina, tornando-a não reativa (Figura 1.9).³²

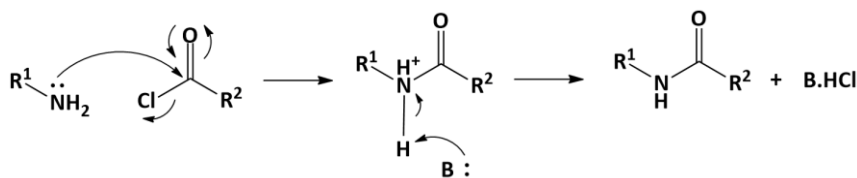


Figura 1.9 Mecanismo de acilação de amida com cloreto de acilo.

A ativação de ácidos carboxílicos com recurso a reagentes de acoplamento é outro método muito utilizado. Estes reagentes formam intermediários reativos dos ácidos carboxílicos, nomeadamente na forma de anidridos mistos, na reação com carbodiimidas, ou na reação com acilimidazoles como o 1,1'-carbonildiimidazole (CDI).²⁹

No caso das carbodiimidas, a primeira a ser introduzida, e ainda muito utilizada atualmente, foi a dicitlohexilcarbodiimida (DCC) por Sheehan e colaboradores em 1955. Outros exemplos mais recentes são a diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) conhecida por ser hidrossolúvel, assim como a ureia correspondente.^{33,34} O mecanismo da reação de um ácido carboxílico com uma carbodiimida está na Figura 1.10 assim como as reações

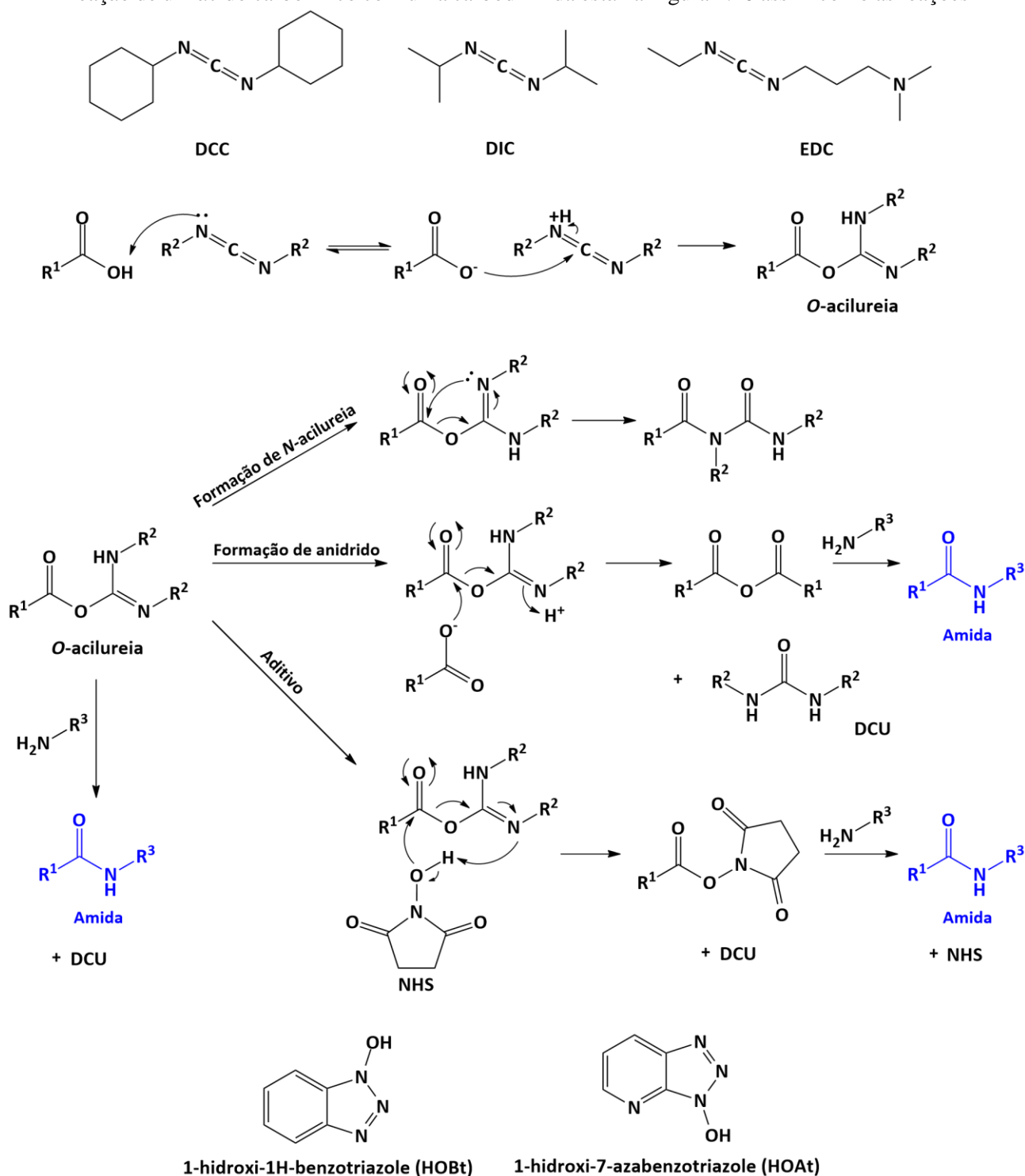


Figura 1.10 Estruturas das carbodiimidas DCC, DIC e EDC em cima. Ao centro, mecanismo da reação de formação de amida com DCC (R^2 =ciclohexil). Pode também ser usado um aditivo após a formação da *O*-acilureia, o NHS por exemplo. O mecanismo para os derivados do benzotriazole são semelhantes. Em baixo, estruturas do HOBT e HOAt, que podem ser utilizados com a mesma função da NHS.

secundárias e as estruturas da DCC, DIC e EDC. A reação com as carbodiimidas forma uma *O*-acilureia reativa. O ataque da amina origina a amida pretendida e um produto secundário, a ureia respectiva, que no caso de se usar DCC é a diciclohexilureia (DCU). Outros produtos que se podem formar são uma *N*-acilureia ou o anidrido do ácido, que ainda pode formar a amida (seriam precisos 2 eq de ácido para se ter uma reação completa).

A reação com carbodiimidas costuma ser acompanhada de outros reagentes que formam um intermediário reativo, mas mais estável do que a *O*-acilureia. É o caso da *N*-hidroxisuccinimida (NHS)³⁰ e o 1-hidroxi-1H-benzotriazole (HOBt) e derivados, inicialmente introduzidos por Koenig e Geiger em 1970.³⁵ Carpino *et al.* em 1994³⁶ reportaram o 1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt) como um aditivo mais eficiente que o HOBt. Estes aditivos formam um éster com o ácido carboxílico, libertando a ureia. Como são bons grupos de saída, o éster formado é reativo e forma facilmente uma amida na presença de uma amina (Figura 1.10).

No caso do CDI, este funciona numa lógica semelhante ao das carbodiimidas, ou seja, ativando o ácido carboxílico formando um aduto com um bom grupo de saída, o imidazole mais concretamente. Na reação com o CDI começa por formar-se um anidrido misto, que é hidrolisado rapidamente pela molécula de imidazole libertada no passo anterior, formando um imidazolido, com reatividade comparável à de um cloreto de acilo. Nesta reação libertam-se imidazole e CO₂. O imidazolido é depois atacado pela amina, originando a amida pretendida e imidazole.³⁷ O mecanismo encontra-se na Figura 1.11.

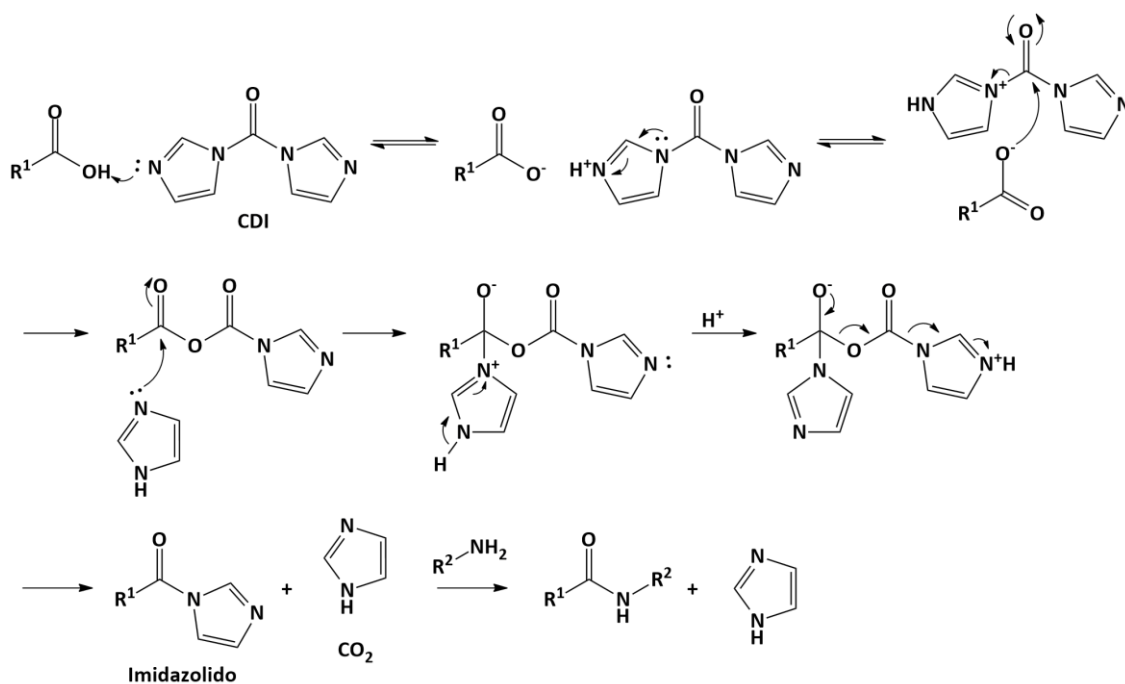


Figura 1.11 Mecanismo da reação de ativação do ácido carboxílico com CDI e formação de amida.

Os métodos anteriormente descritos estão bem implementados e estudados no mundo da síntese orgânica. Contudo, ao olharmos para estes procedimentos percebemos que a quantidade

de reagentes usada para a quantidade de produtos produzida é muito elevada, existindo uma grande produção de produtos secundários, logo uma economia atômica muito baixa. Como tal, a química orgânica em conjunto com a química sustentável viram-se perante a necessidade de encontrar alternativas mais eficientes, como já foi referido por alguns cientistas.^{38,39}

Atualmente, os métodos mais sustentáveis para a formação de amidas incluem o uso de catalisadores. Ishihara *et al.* em 1996 apresentaram os primeiros catalisadores baseados em derivados do ácido borónico.⁴⁰ Bode e Sohn,⁴¹ Vora e Rovis⁴² e Chiang *et al.*⁴³ reportaram o uso de carbenos N-heterocíclicos para a síntese de amidas a partir de formilciclopropanos e aldeídos α,β -insaturados,⁴¹ α -hidroxienonas⁴² e α -haloaldeídos e epoxialdeídos⁴³ em 2007 (Bode e Chiang) e 2009 (Vora). Gunanathan *et al.* em 2007 reportaram uma amidação oxidativa em que acoplavam um álcool e uma amina, com o auxílio de um catalisador de ruténio.⁴⁴

Nesta tese, dado que a derivatização da L-arginina não é um dos principais objetivos, vamos cingir-nos aos métodos tradicionais da síntese de amidas, ou seja, o uso de cloretos de ácido e reagentes de acoplamento.

I.5. Descarboxilação oxidativa de aminoácidos

Na reação de descarboxilação oxidativa de aminoácidos tal como o nome indica, pretende-se remover o grupo carboxilo da arginina e libertá-lo na forma de CO_2 e ao mesmo tempo oxidar a amina resultante a imina. Num sistema biológico, esta reação, provavelmente, seria realizada em dois passos. Primeiro, a descarboxilação com a arginina descarboxilase, que formaria agmatina. Segundo, oxidação da agmatina à imina, possivelmente por uma monoamina oxidase (Figura 1.12). Esta imina poderia formar outros produtos, posteriormente.^{16,19,45}

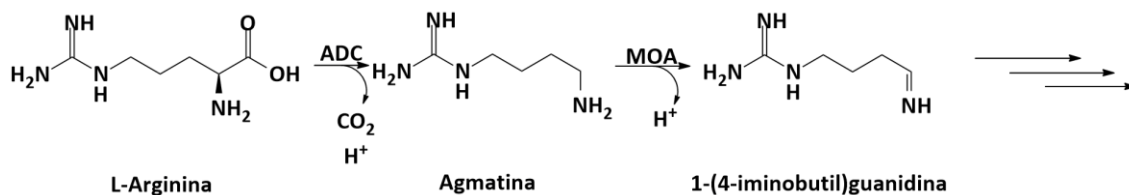


Figura 1.12 Descarboxilação oxidativa de L-arginina nos sistemas biológicos. ADC – Arginina descarboxilase. MOA – Monoamina oxidase. Este mecanismo é apenas plausível, uma vez que na literatura não se encontra nenhuma referência à existência deste mecanismo.

A descarboxilação oxidativa em síntese é uma reação amplamente estudada e explorada. Existe uma enorme panóplia de métodos aplicada a uma gama muito variada de substratos. Uma pesquisa por título “*oxidative decarboxylation*” na plataforma “*Web of Science*” oferece mais de 500 artigos. Nos próximos parágrafos vão ser focados alguns dos métodos que se aplicam à descarboxilação de aminoácidos e derivados.

Como já foi referido num parágrafo anterior, Boto *et al.*¹⁷, desenvolveram um método que visa a descarboxilação oxidativa de aminoácidos num processo suave (Figura 1.5). Este processo conta com o par de reagentes oxidantes, diacetoxiidobenzeno/ I_2 (DIB/ I_2). O DIB é um reagente de iodo hipervalente, I(III) (Figura 1.13). Segundo os autores, este par oxidante forma um radical alquilo no carbono α após a remoção de CO_2 . Por este radical se situar α ao azoto, ocorre nova oxidação com formação de um ião imínio por deslocalização do par não ligante do átomo de azoto. Assim, a posição α torna-se altamente eletrofílica e pode reagir com nucleófilos. Esta reação torna-se interessante do ponto de vista sintético visto que pode dar origem a uma gama variada de produtos, dependendo do nucleófilo. Contudo, estava limitada a derivados acilados ou carbamatos em N^α de L-prolina, L-ornitina e ácido L-glutâmico, sendo que nestes dois últimos obtiveram o produto de ciclização intramolecular, resultado da captura do ião acilimínio pelo nucleófilo da cadeia lateral (Figura 1.13 b) e c)). Nos casos em que usaram L-prolina, o ião foi capturado por água ou metanol, formando um hemiaminal e uma metoxipirrolidina, respetivamente (Figura 1.13 a)).

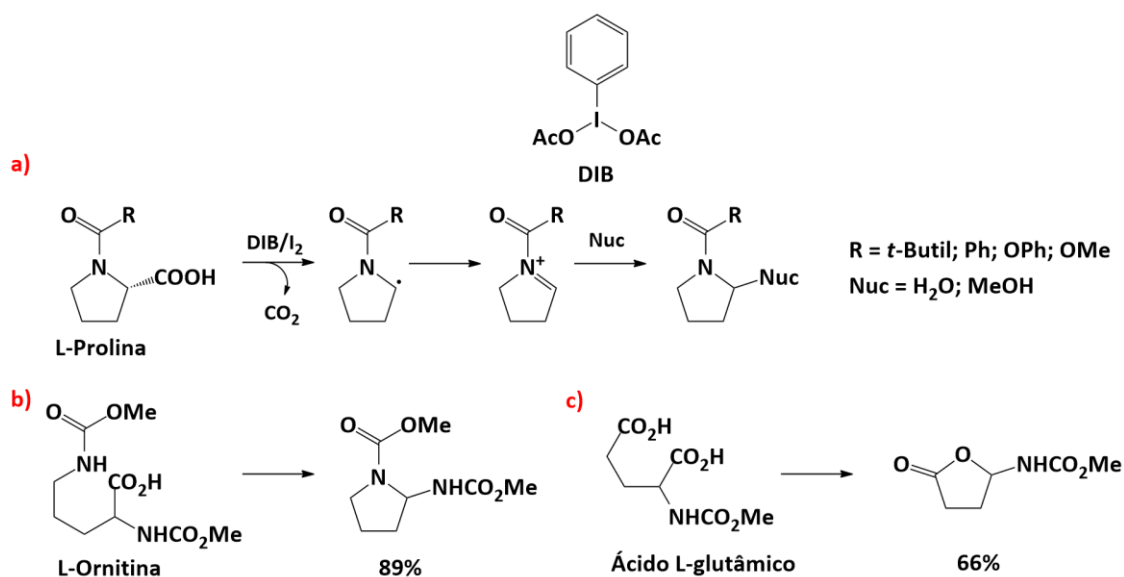


Figura 1.13 Trabalho desenvolvido por Boto *et al.*¹⁹ As reações foram feitas com 2 eq de DIB e 0,5 eq de I₂. Os melhores resultados foram obtidos tendo diclorometano ou acetonitrilo como solvente. a) Reações com L-prolina. b) Reação com L-ornitina em que ocorreu ciclização intramolecular. c) Reação com ácido L-glutâmico em que ocorreu ciclização intramolecular.

Aplicaram também esta reação à síntese de derivados 2,3-substituídos (mono ou di), derivados β -halogenados que podem ser usados para produzir pirrolidinas substituídas, usaram também nucleófilos de carbono para reagir com o imínio, estudaram a estereosseletividade deste método e aplicaram-no à síntese da coniina, o componente ativo do veneno de cicuta (*Conium maculatum*).⁴⁶⁻⁴⁸

Wang *et al.*⁴⁹ combinaram este processo desenvolvido por Boto com uma reação de Friedel-Crafts em que usaram anéis aromáticos (derivados de benzeno, furano, tiofeno, entre outros) como nucleófilos para reagir com o ião acilimínio formado após descarboxilação oxidativa de um derivado de 2-fenilglicina.

Akamanchi *et al.*⁵⁰ em 2011, usaram outro reagente de iodo hipervalente, o ácido *o*-iodoxibenzóico (AIB) em que o iodo está no estado de oxidação +5, para descarboxilarem aminoácidos para os nitrilos correspondentes em solução aquosa de amônia, com rendimentos entre 70 a 90% e tempos de reação de 1 h, aproximadamente, dependendo do aminoácido (Figura 1.14).

Outros métodos para a descarboxilação de aminoácidos incluem o uso de hipohalogenetos, como hipoclorito e hipobromito.

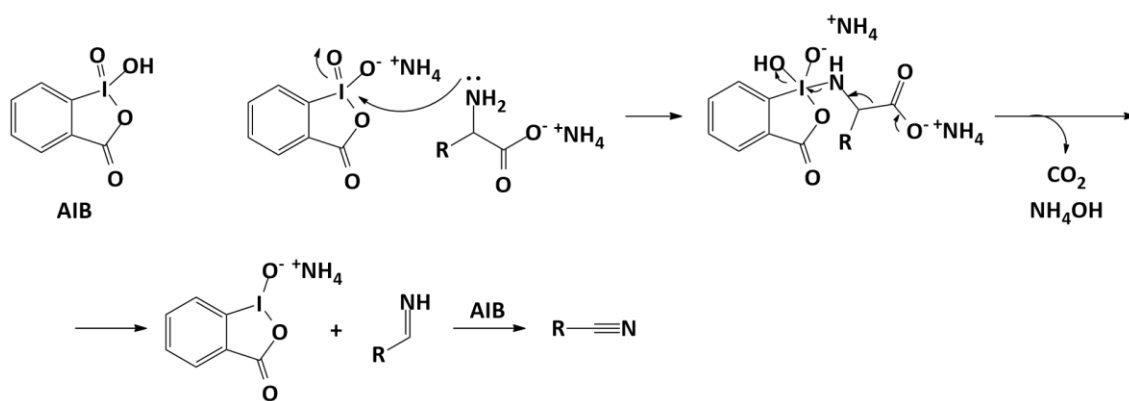


Figura 1.14 Mecanismo de descarboxilação oxidativa proposto por Akamanchi *et al.*⁴⁹ O produto lateral de I(III) pode ser reoxidado a I(V) e reutilizado.

De Vos *et al.*⁵¹ em 2015, desenvolveram um catalisador de peroxotungstato $[W(O_2)_2O_2]^{2-}$, num suporte de duplo hidróxido em camadas (Figura 1.15). Este catalisador na presença de H_2O_2 oxida Br^- *in situ* a Br^+ . Este último é responsável pela descarboxilação oxidativa de aminoácidos a nitrilos. O grupo de De Vos aplicou este sistema à descarboxilação de muitos aminoácidos, incluindo L-arginina, com rendimentos na ordem dos 90%. As reações foram feitas em água ou misturas de água e metanol. Aplicaram-no também à hidrólise do glúten de trigo, como forma de valorizar um produto que de outra forma era um resíduo da indústria agroalimentar, obtendo 92% de conversão total dos aminoácidos presentes no glúten em nitrilos. Estes podem ser usados como reagentes em síntese, posteriormente. Neste artigo, o grupo também propõe um mecanismo para a descarboxilação oxidativa com hipobromito (Figura 1.16).

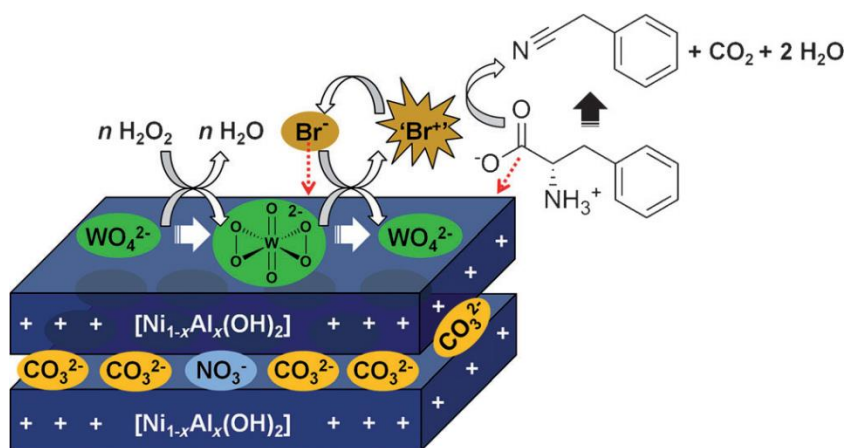


Figura 1.15 Catalisador de peroxotungstato desenvolvido e utilizado por Claes e colaboradores. A figura é uma reprodução de Claes *et al.*⁵⁰

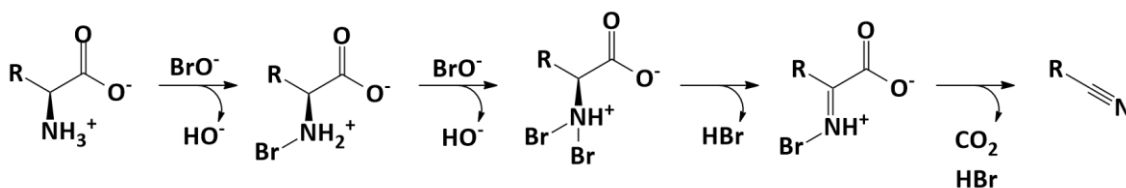


Figura 1.16 Mecanismo proposto para a descarboxilação oxidativa por Claes *et al.*⁵⁰

O mesmo grupo de investigação desenvolveu em 2014 um método de descarboxilação com hipobromito em que este é gerado electroquimicamente no ânodo a partir de NH_4Br .⁵² Os produtos formados são os nitrilos correspondentes, ou aminas e amidas em alguns casos, CO_2 e H_2 , formado no cátodo (Figura 1.17). As reações foram conduzidas numa mistura de metanol/água 13:1 e otimizadas, com rendimentos na ordem dos 90%.

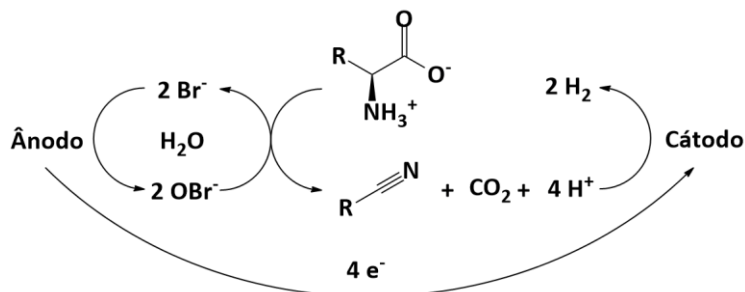


Figura 1.17 Esquema da descarboxilação oxidativa de aminoácidos com OBr^- gerado eletroquimicamente para a obtenção dos nitrilos correspondentes.⁵¹

Laval e Golding⁵³ publicaram em 2003 uma descarboxilação oxidativa de aminoácidos que recorria a *N*-bromosuccinimida (NBS) para obter nitrilos.

Um conjunto de reagentes muito usados em descarboxilação de ácidos é o par prata(I)/peroxidissulfato ($\text{Ag(I)}/\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$). Este foi aplicado pela primeira vez a aminoácidos por Stewart *et al.*⁵⁴ em 1966. Os produtos obtidos após descarboxilação foram aldeídos. Os autores também mostraram que o par mencionado pode oxidar aminas alifáticas, primárias e secundárias, obtendo-se iminas e os respetivos aldeídos.

Anderson e Kochi⁵⁵ estudaram a cinética e o mecanismo da reação de descarboxilação oxidativa e concluíram que esta se deve à geração *in situ* de um ião metaestável de Ag(II) pelo $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$, que tem um potencial de redução muito elevado em água ($E^\circ = 2,01 \text{ V}$).⁵⁶ A Ag(II) gera um radical acilóxilo que se decompõe num radical alquilo e CO_2 . Este radical é depois oxidado por Ag(II) ou por transferência de hidrogénio para o solvente. Os autores estudaram também o efeito sinérgico do Cu(II) . Este atua como um cocatalisador que facilita a oxidação do radical alquilo a um alceno ou álcool. O Cu(I) formado é reoxidado a Cu(II) pelo radical sulfato ou outro dos oxidantes presentes. De facto, Anderson e Kochi verificaram que, na ausência de Cu(II) , o produto maioritário da reação era o alceno correspondente e CO_2 e, na presença de Cu(II) , o produto maioritário era um alceno e CO_2 (Figura 1.18). Estes resultados foram corroborados por Fristad *et al.*⁵⁶, que também mostraram que, na presença de Cu(II) , radicais alquilo secundários podem originar alcenos ou álcoois e radicais alquilo terciários geram exclusivamente álcoois. Os resultados dos autores⁵⁴⁻⁵⁶ sugerem que a obtenção de produtos de dupla oxidação também é possível, dado que obtiveram cetonas e aldeídos. Fristad *et al.*⁵⁶ destacam as vantagens deste método, dado que o peroxidissulfato é barato, usa-se uma quantidade catalítica de prata e cobre e as reações podem ser feitas em água e à temperatura ambiente ou moderada.

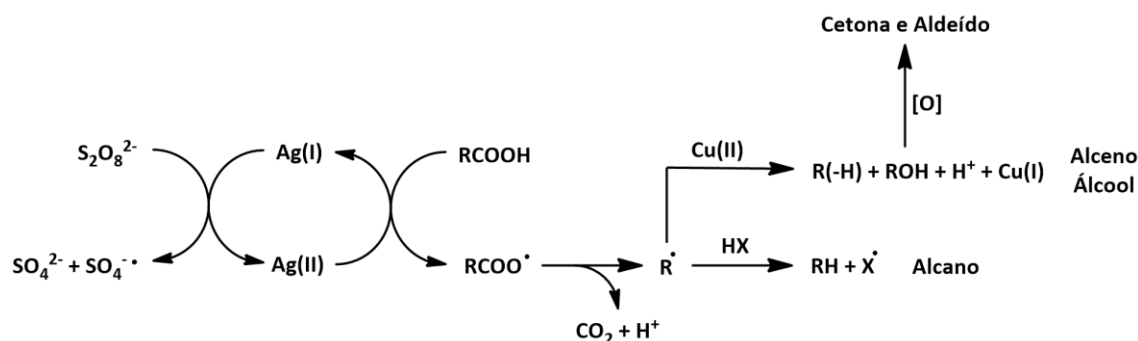
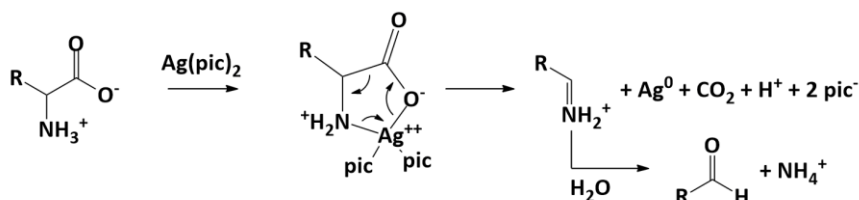


Figura 1.18 Mecanismo de descarboxilação oxidativa de ácidos carboxílicos alifáticos por Ag(I)/S₂O₈²⁻, proposta por Anderson e Kochi.⁵⁴ HX é a transferência de H que pode ocorrer com o solvente, formando o alceno. Os álcoois formados podem ser oxidados pelos oxidantes [O] presentes na mistura reacional (Ag(II), SO₄^{•-}, etc.).^{54,55}

Como foi dito anteriormente, o ião Ag²⁺ é metaestável e gerado *in situ*, contudo é possível isolá-lo quando se usam ligandos aromáticos nitrogenados, como o ácido picolínico, formando o sal picolinato de prata (II), Ag(pic)₂. O óxido de prata (II) também é um sal estável.^{54,57} Os trabalhos de Clarke *et al.*⁵⁷ e Silverman e Zelechonok⁵⁸ ajudaram a elucidar os mecanismos da reação de descarboxilação oxidativa com aminoácidos. Os segundos autores concluíram que a descarboxilação com Ag(pic)₂ procede por um mecanismo diferente da mesma reação usando Ag(I)/S₂O₈²⁻. Quando se usa Ag(pic)₂ a reação procede por um mecanismo concertado, corroborando a proposta de Clarke *et al.*⁵⁷ e quando se usa Ag(I)/S₂O₈²⁻ tem-se a formação de um radical na posição α-amino (Figura 1.19).

Mecanismo de descarboxilação oxidativa com Ag(pic)₂



Mecanismo de descarboxilação oxidativa com Ag(I)/S₂O₈²⁻

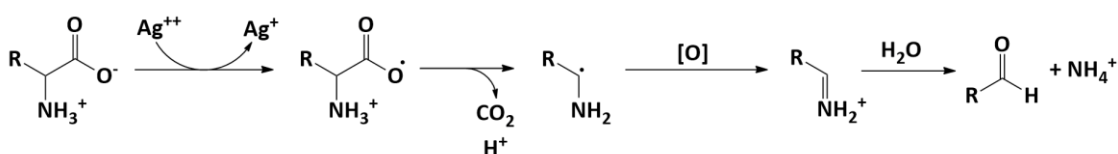


Figura 1.19 Mecanismos de descarboxilação oxidativa com Ag(pic)₂ e Ag(I)/S₂O₈²⁻, respetivamente, propostos por Silverman e Zelechonok.⁵⁷ A Ag⁰ formada no primeiro mecanismo é reoxidada a Ag(I) pela Ag(pic)₂ em solução. [O] pode ser Ag²⁺ ou o radical SO₄^{•-}.

Mais recentemente, em 2008, Huang *et al.*⁵⁹ aplicaram o método de Ag(I)/S₂O₈²⁻/Cu(II) à descarboxilação oxidativa de aminoácidos *N*-acilados para obterem imidas. No seu trabalho debateram-se com o facto de ocorrer uma reação paralela, uma clivagem oxidativa do produto de hidrólise do ião acilimínio, formado após descarboxilação (Figura 1.20). Esta clivagem oxidativa gera um aldeído da cadeia lateral do aminoácido e a amida do grupo de proteção.⁶⁰ Ao

introduzirem Cu(II) na reação conseguiram obter a imida, demonstrando que o cobre tem um papel importante na reação. Contudo, esta reação contém várias limitações ao nível de substratos.

O mesmo grupo alcançou a síntese de *N*-acil-*N'*-formil amina reagindo o íon acilimínio com formamida.⁶¹

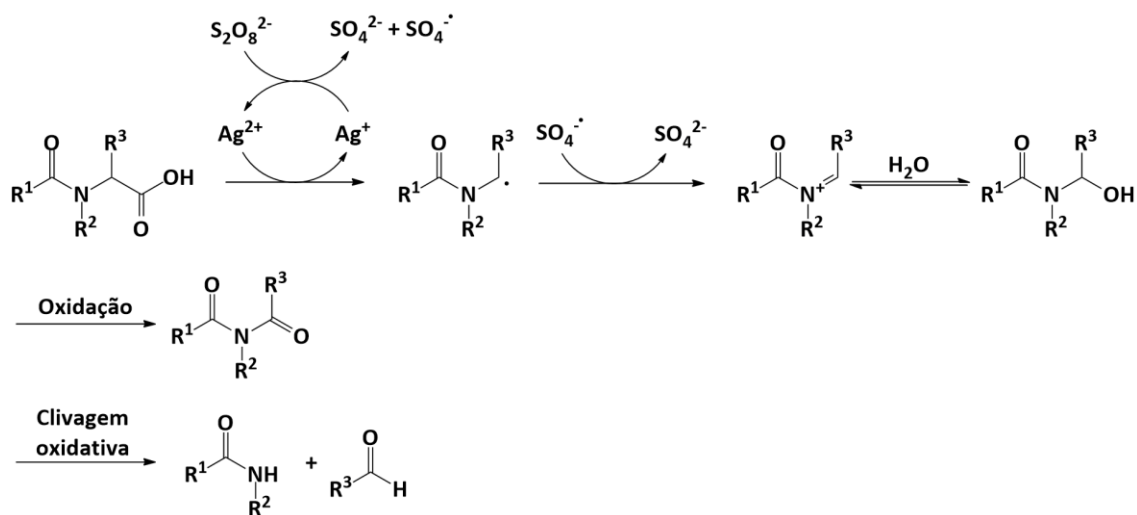


Figura 1.20 Mecanismo proposto por Huang *et al.*⁵⁹

Tendo os conteúdos da introdução em mente, nesta tese destacam-se dois principais objetivos. Em primeiro, o desenvolvimento de uma metodologia para a síntese do núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina. Em segundo, a síntese da cernumidina A e análogos.

II. Discussão de resultados

II. Discussão de resultados

II.1. Preâmbulo

No grupo de investigação foram planeadas duas vias sintéticas para alcançar o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il-carboxamidina (Figura 1.2, assinalado a vermelho) presente na cernumidina e que nunca tinha sido reportado na literatura. Uma tem como material de partida a L-prolina envolvendo a descarboxilação a um ião imínio e posterior alquilação com nucleófilos apropriados. Outra abordagem, tentando mimetizar a via biológica terá como material de partida a L-arginina que após *N*-derivatização e descarboxilação ao intermediário imínio sofre ciclização intramolecular ao núcleo carboxamidina. O trabalho que consistiu o foco desta tese centra-se exclusivamente na via biomimética (Figura 2.1). Parte-se da L-arginina (**1**) que é acilada em *N*^α ao composto **2** o qual sofre em seguida descarboxilação oxidativa, formando um intermediário que cicliza por via intramolecular de maneira semelhante a processos descritos anteriormente,^{16,17} formando assim o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina (**3**).

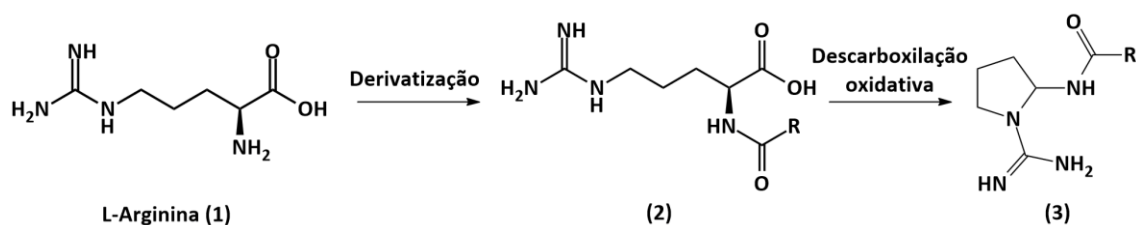


Figura 2.1 Plano de síntese biomimética para o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina e para a cernumidina.

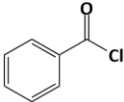
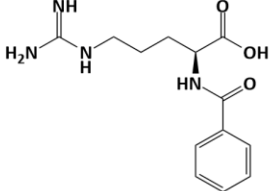
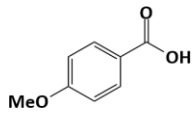
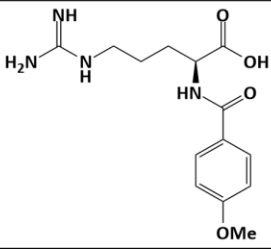
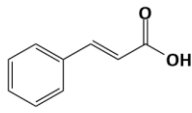
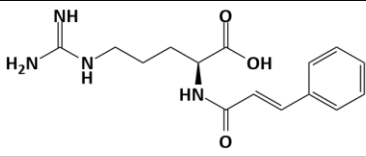
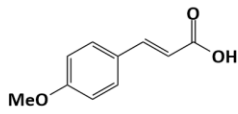
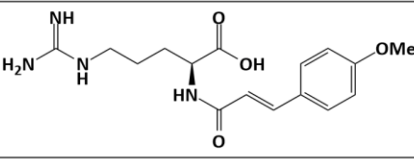
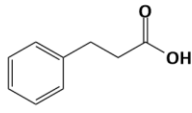
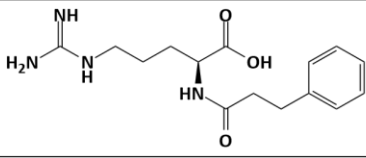
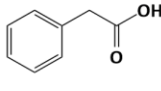
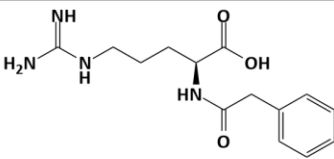
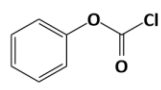
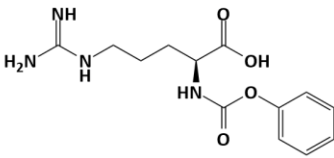

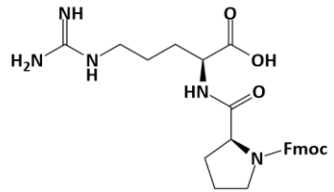
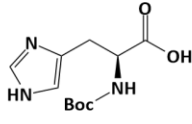
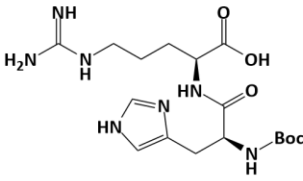
II.2. Reação de N^{α} -derivatização de L-arginina

Na síntese planeada, o primeiro passo foi a derivatização da L-arginina (**1**) em N^{α} . Para tal utilizaram-se vários reagentes, que estão sumarizados na Tabela 2.1. Nesta reação, pretendia-se formar uma amida ou um carbamato. Como tal, era necessário que ocorresse o ataque nucleofílico da amina da L-arginina ao carbonilo do ácido carboxílico do reagente de derivatização. Como já foi dito no subcapítulo 1.4, a formação de amida é um processo termodinamicamente pouco favorecido, devido à fraca reatividade dos ácidos carboxílicos e como tal estes têm de ser tornados mais reativos.²⁸ Para o efeito, recorreu-se a um de dois processos, formação do cloreto de ácido correspondente ou ativação do ácido carboxílico com reagentes de acoplamento, nomeadamente DCC e CDI. Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.1.

Na Tabela 2.1 não foram indicados processos para a obtenção de (**2a**) e (**2g**) porque o reagente usado foi o cloreto de ácido comercial por isso as reações foram feitas por adição direta do cloreto de ácido respetivo à L-arginina em solução aquosa basificada.

No caso dos reagentes de acoplamento, o CDI mostrou ser um reagente melhor que o DCC, dados os resultados obtidos. O DCC é conhecido pela sua ureia correspondente, a DCU, ser praticamente insolúvel em todos os solventes e, como tal, esta tem que ser filtrada após a reação com uma amina ou com um aditivo, como NHS.³³

Tabela 2.1 Reagentes de derivatização, respectivos produtos, melhores rendimentos obtidos nas reações de derivatização de L-arginina e o processo (cloreto de ácido ou reagente de acoplamento) com que se obteve esse rendimento.

Entrada	Reagente de derivatização (4)	Arginina derivatizada (2)	Rendimento (%)	Processo
1	a 		47	-
2	b 		59	CDI
3	c 		44	Cloreto de ácido
4	d 		55	CDI
5	e 		63	Cloreto de ácido
6	f 		81	Cloreto de ácido
7	g 		38	-
8	h 		8 ^{a,b}	Cloreto de ácido
9	i 		31	CDI

a. Produto obtido foi o dipéptido desprotegido; b. Rendimento calculado por ¹H RMN.

Nas reações em que o processo usado para a ativação do ácido carboxílico (**4**) foi o cloreto de ácido, utilizou-se SOCl_2 para o efeito (Tabela 2.1, entradas 3, 5, 6 e 8). O mecanismo de formação do cloreto de ácido e a posterior reação com a L-arginina estão nas figuras 1.8 e 1.9, respectivamente.

Nas reações em que se usaram reagente de acoplamento, o objetivo era a obtenção do intermediário reativo, isto é, o ácido carboxílico ativado. No caso do DCC, este era a *O*-acilureia (Figura 1.10) e no caso do CDI, este era o imidazólido (Figura 1.11).

As reações foram acompanhadas por *TLC* e reveladas com ninidrina e reagente de Dragendorff. A ninidrina é particularmente útil para aminoácidos, visto que estes adquirem uma tonalidade roxa na sua presença.⁶² O reagente de Dragendorff permite identificar alcaloides ou compostos azotados através da presença de azotos básicos e estes costumam adquirir uma tonalidade laranja. Assim, no contexto das reações realizadas, a ninidrina permite visualizar o desaparecimento da L-arginina, que foi o reagente limitante em todas as reações e o reagente de Dragendorff permite visualizar o aparecimento do produto (**2**). Na prática, verificou-se que os compostos (**2**), que são amidas secundárias, adquiriam uma cor amarela semelhante ao que acontece com aminas secundárias e imino ácidos na presença de ninidrina, como é o caso da L-prolina e da hidroxiprolina. Essa reação passa pela oxidação da amina formando uma imina^{63,64}. Harding e MacLean⁶⁵ reportam que a guanidina não reage com ninidrina, portanto as manchas coradas não são o resultado da presença da guanidina. Os mesmos autores, referem que amidas não reagem com ninidrina mas os fenómenos observados, isto é, o surgimento de uma mancha amarela, sugerem o contrário. Como era esperado, a L-arginina (**1**) adquiriu cor roxa, conhecido como roxo de Ruhemann.⁶⁶ Infelizmente, a revelação com reagente de Dragendorff gerava manchas com cores muito desvanecidas e dificilmente perceptíveis e por isso não foi usado com frequência na monitorização destas reações, sendo dada preferência à ninidrina.

A obtenção de todos os compostos referidos na Tabela 2.1 foi confirmada por ^1H RMN e IV. No espectro de ^1H RMN, esperava-se uma alteração no desvio químico do sinal do próton α do aminoácido para campo baixo de 3,76 ppm para ca. 4,4 ppm, bem como o aparecimento de sinais na zona de δ 7-8 ppm, correspondentes aos prótons aromáticos, adquiridos através do reagente acilante (**4**). No espectro de IV verificou-se o aparecimento da banda correspondente a uma amida, a 1670 cm^{-1} . No caso do carbamato a banda correspondente encontrava-se a 1720 cm^{-1} .

Os procedimentos realizados para a obtenção de cada composto e a sua caracterização estão descritos com mais detalhe no capítulo **IV.2**.

O composto (**2a**) foi obtido por adição direta do cloreto de benzoílo, como já foi dito num parágrafo anterior. O espectro de ^1H RMN revela a presença de um duplete de dupletos a δ 4,41 ppm, correspondente ao próton α do aminoácido derivatizado. Também se identificaram os prótons aromáticos, sendo que a integração total dos sinais e a multiplicidade estavam de acordo com os 5 prótons do anel aromático. O espectro ^1H RMN da N^α -benzoílo-L-arginina (**2a**) encontra-se na Figura 2.2. O espectro de IV permite identificar a presença de uma banda a 1677 cm^{-1} , que corresponde à amida formada. Esta reação tem um rendimento relativamente baixo, dada a sua simplicidade. Isto pode prender-se com o facto de não ter sido usada base suficiente. Usou-se apenas 1,6 eq de Na_2CO_3 , pelo que a amina da L-arginina pode ter ficado protonada e assim não reativa. Este composto foi feito em grande quantidade porque serviria de estudo para a otimização das condições das reações de descarboxilação oxidativa. Escolheu-se a N^α -benzoílo-L-arginina e não um derivado mais simples, como a N^α -acetil-L-arginina, porque o primeiro aproxima-se mais da estrutura da cernumidina (Figura 1.2) que o último, sendo ainda relativamente simples de trabalhar.

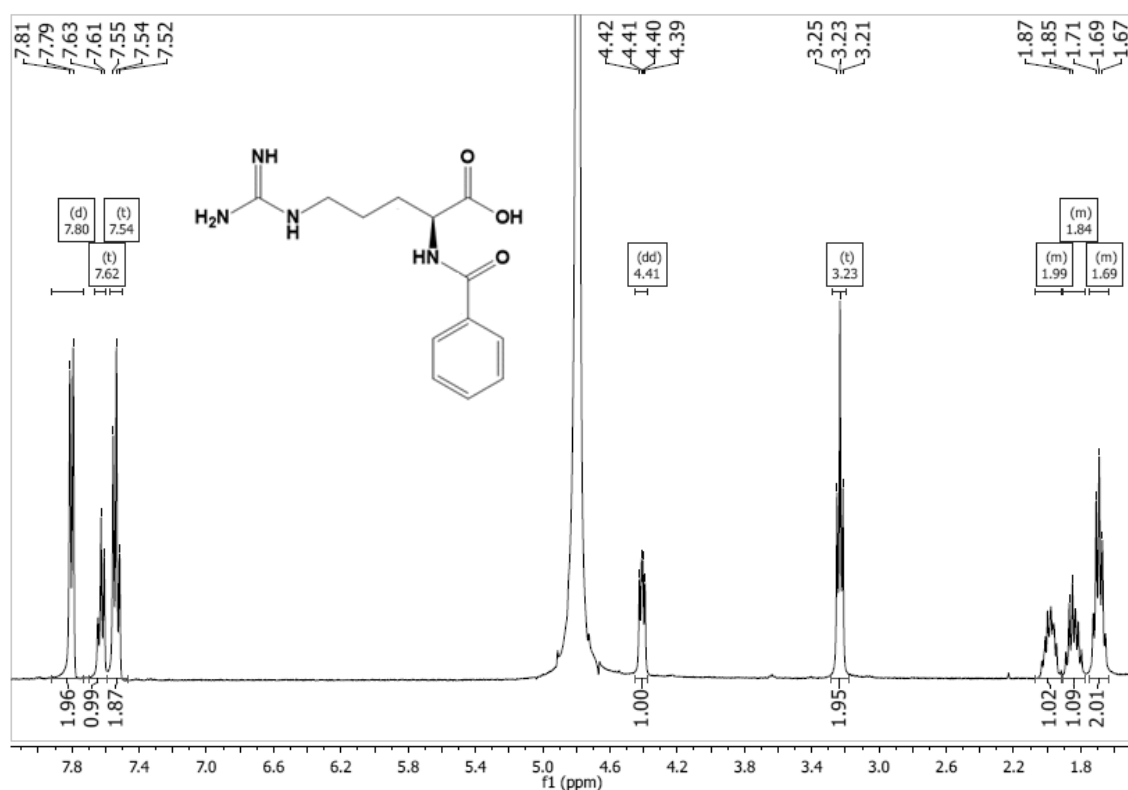


Figura 2.2 Espectro de ^1H RMN de N^α -Benzoílo-L-arginina (**2a**) em D_2O .

O composto (**2b**) foi obtido com 59% de rendimento, através da reação com o reagente de acoplamento CDI. No espectro ^1H RMN (Figura 2.3) isto é confirmado pelo sinal singuleto a δ 3,88 ppm correspondente aos prótons do grupo metóxico e pelos sinais dupletos dos prótons aromáticos a δ 7,79 e 7,05 ppm. Tal como aconteceu com o composto (**2a**), o sinal do próton α surge a δ 4,40 ppm, campo mais baixo que o α da L-arginina.

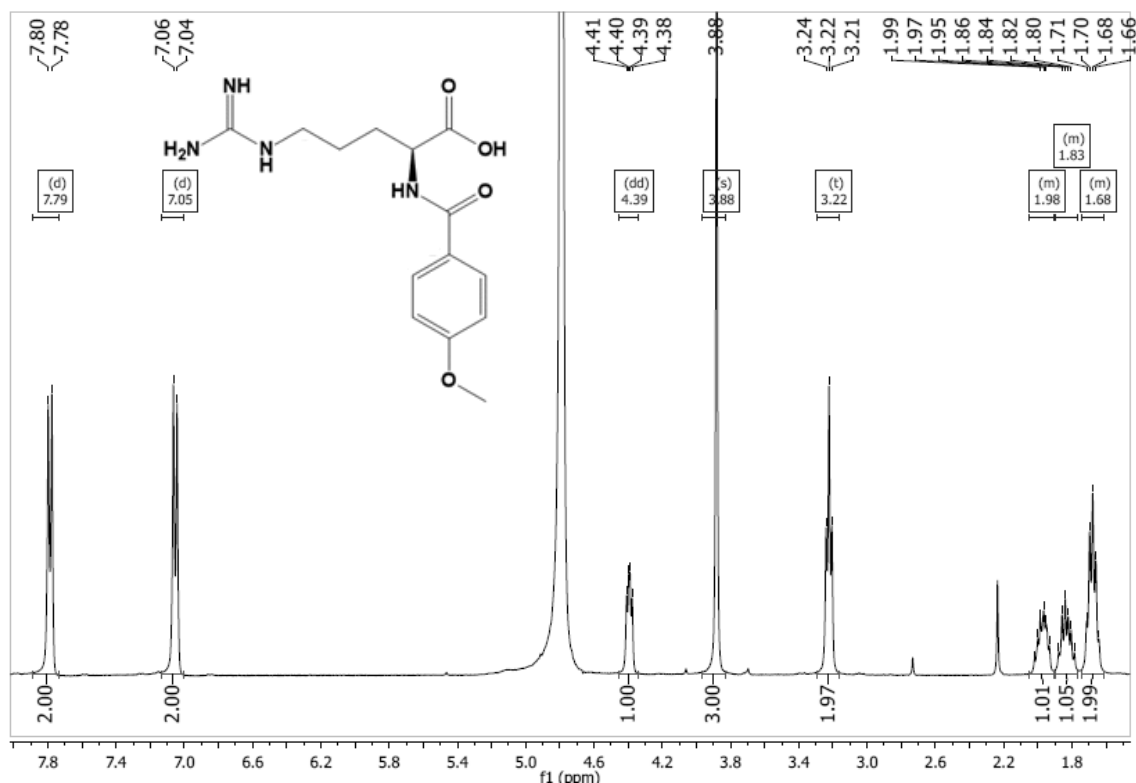


Figura 2.3 Espectro ^1H RMN de N^α -*p*-metoxibenzóil-L-arginina (**2b**) em D_2O .

O composto (**2c**) mostrou-se mais difícil de obter. O melhor rendimento conseguido foi de 44%, (Tabela 2.1, entrada 3) numa reação em que se recorreu à formação do cloreto do ácido cinâmico para reagir depois com a L-arginina. No espectro de ^1H RMN (Figura 2.4), foi possível identificar o produto (**2c**) através dos sinais característicos já referidos para o resíduo da L-arginina, nomeadamente o duplete de dupletos do próton α a δ 4,47 ppm, e pela presença dos sinais da dupla *trans* do resíduo cinamoílo, com $J = 15,8$ Hz, e dos prótons aromáticos do mesmo.

Foram realizados vários ensaios para se obter (**2c**), quer através da formação de cloretos de ácido (Tabela 2.2), quer através de reagentes de acoplamento (Tabela 2.3). O resumo das condições destes ensaios está descrito nas Tabelas 2.2 e 2.3, e as condições experimentais no procedimento experimental em **IV.2**. As tabelas indicam as condições para a formação do cloreto de ácido por reação com o SOCl_2 (Tabela 2.2) ou do intermediário por ativação do ácido com o

reagente de acoplamento (Tabela 2.3) seguidas das condições de formação da amida na reação com a arginina (condições básicas para armadilhar o HCl formado (Tabela 2.2) ou pelo recurso a um aditivo após a formação da O-acilureia (DMAP, NHS, Tabela 2.3).

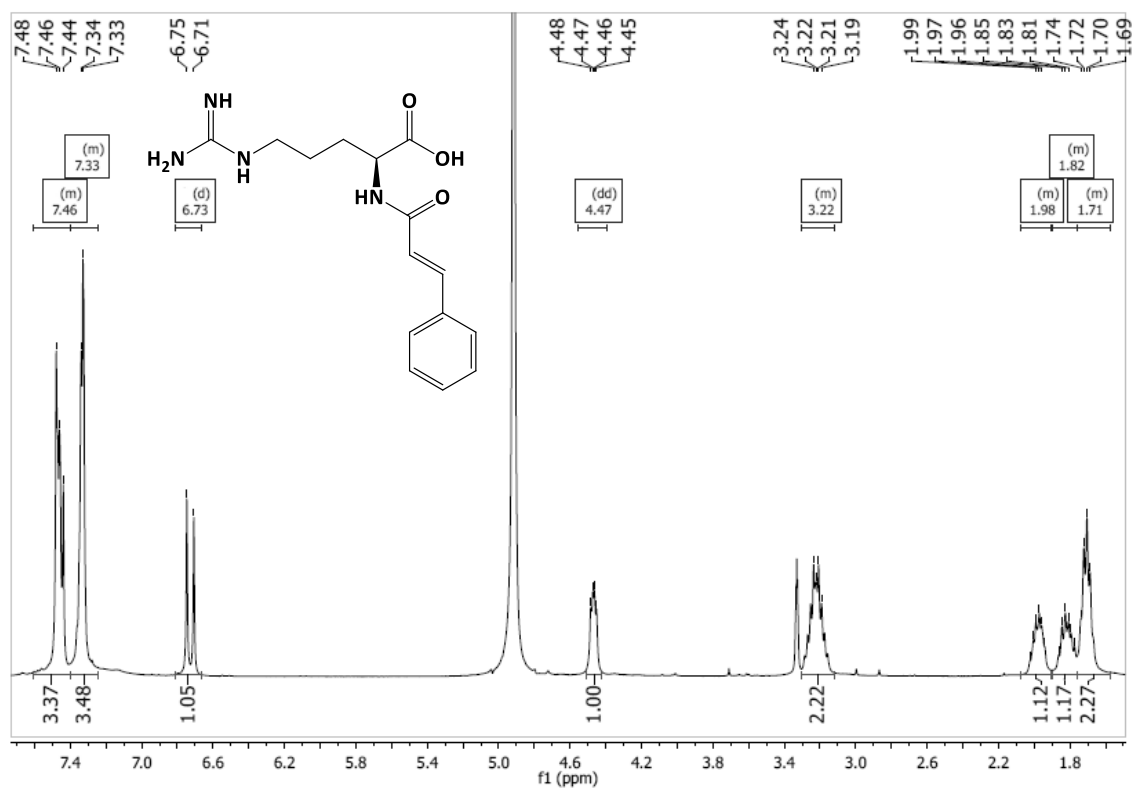


Figura 2.4 Espectro de ^1H RMN do produto N^ϵ -(*E*)-(3-fenil)acrilóil)-L-arginina (**2c**), em CD_3OD .

Tabela 2.2 Síntese das condições usadas nas reações para a obtenção de (**2c**), através da formação do cloreto de ácido. Utilizou-se solventes secos na formação do cloreto de ácido.

Entrada	Formação do cloreto de ácido			Formação de amida		
	Eq SOCl_2	Solvente	$t_{\text{reação}}$ (h)	Base (eq)	Solvente	η (%)
1	2,8	-	3	Na_2CO_3 (1,5)	H_2O	<1
2	3,2	-	3	Na_2CO_3 (1,2)	DMF	11
3	3,2	DMF cat	3	-	DMF	24
4^a	10	Tolueno	1	Na_2CO_3 (0,6)	H_2O	44

a. Ensaio detalhado no subcapítulo IV.2.1.3.

Tabela 2.3 Síntese dos métodos para a obtenção de (2c). Utilizou-se solventes secos, quer na formação do intermediário, quer na formação da amida. Para 1 eq de L-arginina, usou-se 1,1 eq de ácido, 1,2 eq de DCC ou CDI, 0,125 eq de DMAP e 1,2 eq de NHS. Para 250 mg de ácido, utilizou-se 5 mL de DCM seco. Para 250 mg de L-arginina, utilizou-se 10 mL de DMF.

Entrada	Formação do intermediário			Formação de amida		
	Reagente	Solvente	t _{reação} (h) ^a	Reagente	Solvente	η (%)
1	DCC	DCM	0,25	DMAP	DMF	2
2	DCC	DCM	0,25	DMAP, NHS	DMF	11
3 ^b	CDI	DCM	0,5	DMAP	DMF	37

a. O consumo do ácido foi monitorizado por TLC. b. Ensaio detalhado no capítulo IV.2.2.3.

A informação providenciada pelas tabelas será discutida nos próximos parágrafos. Para efeitos de clareza, cada ensaio será denominado de acordo com a tabela em que se encontra.

Em termos cronológicos, os ensaios descritos na Tabela 2.2, entrada 1, 2 e 3 e Tabela 2.3, entrada 1 e 2, decorreram temporalmente muito próximos e no início da investigação. Uma das razões que contribuiu para as alterações nestes ensaios foi a dificuldade em definir o produto nas TLC. Isto porque não se tinha certeza da polaridade do produto, o que pode ter levado a que fossem cometidos erros na purificação, levando a perdas de produto e a rendimentos infrutíferos. Mais tarde, percebeu-se que os sistemas de eluentes usados nestes ensaios não eram ideais pois eram demasiado apolares (o eluente mais polar era DCM/MeOH 20%) e a mancha do produto ficava sobreposta com outras. Por essa razão, experimentaram-se vários sistemas de eluentes com as amostras que foram obtidas em pequena quantidade, chegando-se à conclusão de que a mistura DCM/MeOH/H₂O na proporção 13:7:1 era a que produzia a melhor separação dos componentes da mistura reacional e permitia identificar claramente a mancha do produto. Neste momento também se verificou que os produtos (2) adquiriam cor amarela quando revelados com ninidrina.

Começou-se por tentar alcançar o produto através do cloreto de ácido, nas condições descritas na Tabela 2.2, entrada 1. Estas condições foram utilizadas no grupo de investigação, anteriormente, para a obtenção de cloretos de ácido. Após a reação obteve-se um óleo vermelho escuro, que se adicionou à solução de L-arginina, adicionando-se depois Na₂CO₃ como base. O baixo rendimento pode ser resultado da adição da base depois do cloreto de ácido. Ora, como já foi referido, a amina protonada não reage. Numa solução neutra, a L-arginina encontra-se protonada na amina e na guanidina e desprotonada no ácido. A amina da arginina tem um pK_a de 9,09,⁶⁷ o que significa que a pH neutro uma grande fração da amina está protonada. Logo, a maior parte do cloreto de ácido foi hidrolisado a ácido cinâmico. Doravante, passou a ser necessário tentar evitar a destruição do cloreto de ácido.

Por essa razão, no descrito na Tabela 2.2, entrada 2 fez-se a reação com L-arginina dissolvida em DMF e adicionou-se a base dissolvida em H₂O. Apesar do rendimento obtido ser melhor, continuou a ser muito baixo. No ensaio seguinte (Tabela 2.2, entrada 3) tentou fazer-se a reação sem água. Além disso, decidiu-se adicionar DMF catalítico na reação de formação do cloreto de ácido com cloreto de tionilo. O DMF reage com o cloreto de tionilo formando o catalisador de Vilsmeier-Haack, que é atacado pelo ácido. O intermediário resultante, um éster ativado, é atacado pelo ião cloreto no carbonilo, tendo como grupo de saída o DMF²⁹ (Figura 2.5). Além disso, para evitar a adição de água, fez-se a reação sem base. O rendimento melhorou face ao ensaio anterior, mas não o suficiente. É possível que se tenha perdido produto no *work-up* da reação.

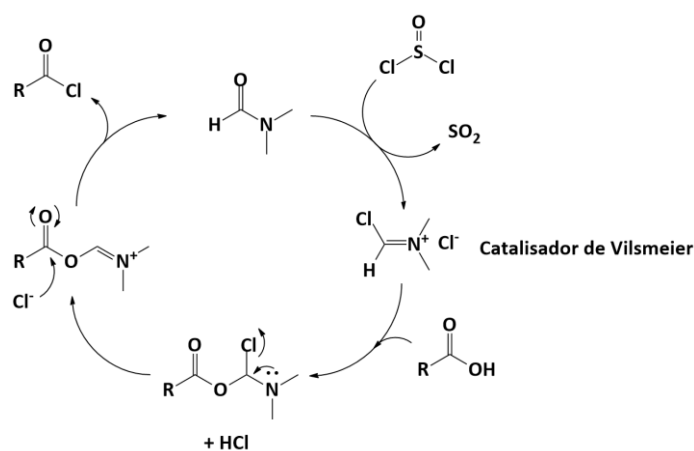


Figura 2.5 Mecanismo de formação de cloreto de ácido através de reação com cloreto de tionilo com catálise de DMF.

No descrito na Tabela 2.2 entrada 4, decidiu-se tentar a reação novamente em H₂O, desta vez adicionando-se o cloreto de ácido a uma solução basificada de L-arginina. As condições de formação do cloreto de ácido também foram alteradas, passando a fazer-se a reação em tolueno, aproximadamente 0,5 M em concentração do ácido, e com 10 eq de SOCl_2 . Como primeiro resultado, o tempo de reação foi menor. O óleo obtido era laranja e não vermelho escuro, como nos ensaios anteriores. Mesmo sendo feita em água e usando menos base, obteve-se o melhor rendimento de todos os ensaios. A reação não foi completa e é possível que não se tenha usado base suficiente, contribuindo para que o rendimento não seja ótimo. Perdas de produto no *work-up* e na coluna também podem ser considerados.

Quanto ao recurso a reagentes de acoplamento para ativação do ácido, começou-se por fazer os ensaios descritos na Tabela 2.3, entradas 1 e 2.

No primeiro ensaio (Tabela 2.3, entrada 1) não se adicionou NHS. Neste tentou purificar-se o crude numa coluna de sílica gel. O eluente mais polar usado foi DCM/MeOH 9:1, que mais tarde se revelou ter sido um erro, visto que este solvente era ineficaz para eluir o produto. Ainda

assim, conseguiu-se eluir e percebeu-se que só se formou uma pequena quantidade de produto. A partir destes resultados decidiu-se utilizar invariavelmente uma coluna de sílica de fase reversa RP-18 caso fosse necessário separar-se uma mistura, por esta ser mais adequada para separar compostos polares.

Dada a instabilidade do intermediário *O*-acilureia formado e as reações laterais que podem ocorrer, decidiu-se introduzir NHS na reação (Tabela 2.3, entrada 2). Este forma um intermediário estável quando reage com a *O*-acilureia, enquanto que o DCC é filtrado e removido da reação³⁰ (Figura 1.10). O rendimento obtido foi melhor que no ensaio anterior, mas ainda assim mau.

Na perspetiva de tentar melhorar o rendimento, alterou-se o reagente de acoplamento para CDI (Tabela 2.3, entrada 3). O CDI forma um intermediário imidazolido reativo com o ácido, libertando CO₂ e imidazole no processo. O intermediário é atacado pela L-arginina. O mecanismo está na Figura 1.11. Neste caso obteve-se o melhor rendimento de todos os ensaios com reagentes de acoplamento e prosseguiu-se a usar o CDI como o reagente de acoplamento de eleição. O uso do CDI apresenta uma vantagem face ao DCC uma vez que o intermediário imidazolido não pode sofrer uma reação intramolecular como a que acontece na formação da *N*-acilureia.

Dada a referida instabilidade dos intermediários *O*-acilureia e imidazolido e a elevada presença de grupos funcionais na L-arginina, uma das razões destes baixos rendimentos podem ser reações laterais com o ácido e/ou a guanidina do aminoácido. É importante salientar que nas reações em DMF a guanidina e o ácido encontram-se neutros e por isso passíveis de reagir, o que não acontece em água. A acrescentar a estas, estão também as mencionadas reações laterais da *O*-acilureia, nomeadamente a formação da *N*-acilureia, no caso do DCC. Isto é suportado pela observação das *TLC*. Comparativamente, uma *TLC* de uma reação em que se usou o método do cloreto de ácido tem um aspeto mais “limpo” do que uma *TLC* de uma reação em que se usou o método dos reagentes de acoplamento. Isto resulta do facto das reações com DCC ou CDI produzirem mais resíduos, DCU e NHS (se for usado) e imidazole, respetivamente, além do ácido e da arginina não reagidos. Por outro lado, a reação com cloretos de ácido produz apenas HCl além do ácido e arginina que não reagiram.

A principal desvantagem do uso de reagentes de acoplamento é a necessidade de fazer a reação com a L-arginina em DMF, visto que o aminoácido é pouco solúvel ou mesmo insolúvel noutro solvente que não seja água.^{68,69} No entanto, nestas condições as reações têm que ser feitas em solventes orgânicos secos, sob pena de se obter menores rendimentos. Olhando para este facto doutro prisma, a remoção da L-arginina não reagida é facilitada uma vez que basta apenas filtrar a mistura reacional. O DMF tem um ponto de ebulição muito elevado e removê-lo por destilação num rotavapor é uma tarefa difícil, dispendiosa e morosa. Para contornar este problema, fez-se a

destilação a vácuo, recorrendo a uma bomba de óleo mais potente que as bombas dos rotavapores. Ainda assim, foi necessário chegar a temperaturas à volta dos 80 °C para se destilar o DMF.

Tendo em conta o que foi dito ao longo destes parágrafos relativamente à comparação entre os dois métodos, considera-se que o uso de cloretos de ácido para se obter os produtos (**2**) é mais vantajoso, nomeadamente do ponto de vista da simplicidade e do *work-up* e também pelos rendimentos obtidos.

Contudo, o produto (**2d**) foi obtido com 55% de rendimento através, ainda, de ativação do ácido respetivo com CDI. Este foi identificado no espetro de ¹H RMN (Figura 2.6) pelo desvio característico do protão α da arginina para campo baixo a δ 4,46 ppm, pela presença do singuleto do metoxilo a δ 3,82 ppm, dos dupletos da dupla ligação *trans* com *J* = 15,7 Hz e o aparecimento de dois dupletos aromáticos, confirmando que o grupo metoxilo está na posição 4 do anel em para. O espetro (Figura 2.6) mostra que o composto (**2d**) não foi obtido puro. É possível ver que existe DMF na amostra, evidenciada pelos sinais singuletos a δ 3,01 e 2,88 ppm correspondentes aos metilos ligados ao azoto. Isto significa que a evaporação do solvente não foi completa e mesmo na coluna RP-18 não foi possível separá-lo do produto. Devido à presença de DMF, a separação pode não ter sido totalmente eficaz, como se pode ver pela presença de sinais de baixa intensidade no espetro da Figura 2.6. Na mesma linha do que já foi dito em parágrafos anteriores, relativos à síntese de cinamoíl-L-arginina (**2c**), isto mostra a dificuldade acrescida de trabalhar com DMF, devido à sua difícil remoção. Esta é mais uma razão pela qual se deu preferência ao método dos cloretos de ácido.

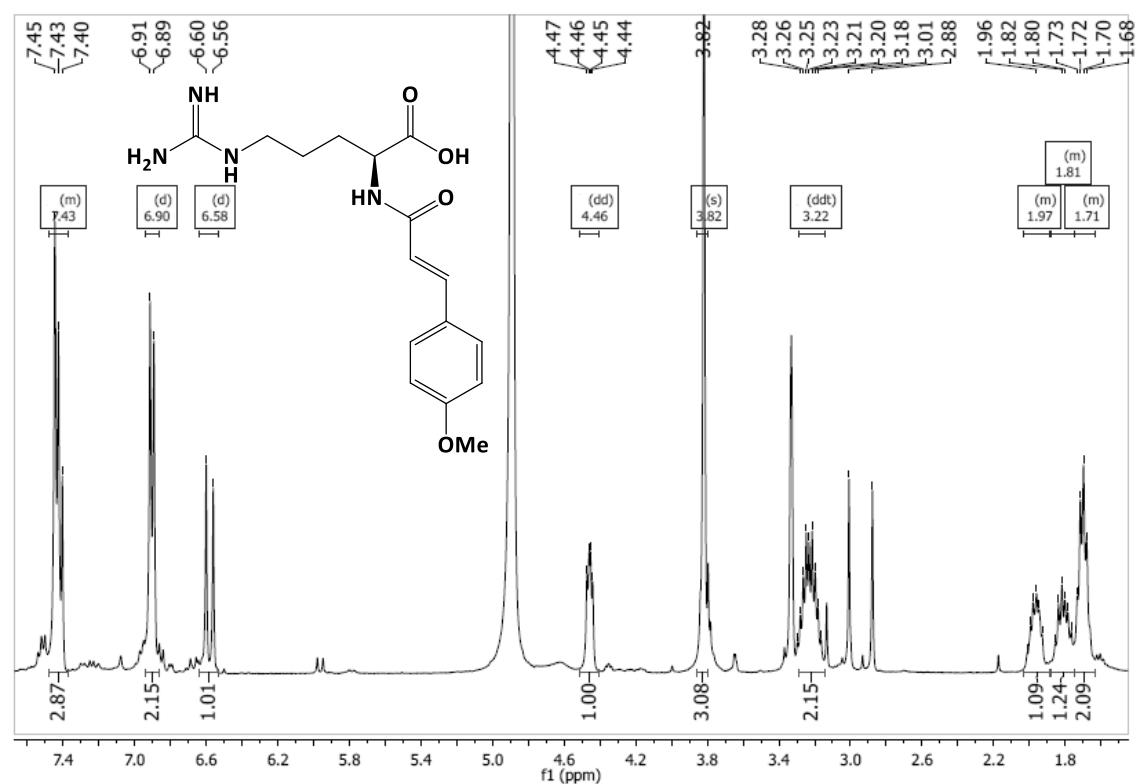


Figura 2.7 Espetro de ^1H RMN de N^α -(*E*)-(3-(*p*-metoxifenil)acrilóil)-L-arginina (**2d**), em CD_3OD .

O composto (**2e**) foi obtido com 63% de rendimento através do método da formação do cloreto de ácido. O produto foi identificado no espectro de ^1H RMN (Figura 2.6) pelo sinal duplete de dupletos a δ 4,05 ppm, a campo mais alto que os anteriores devido a não existir conjugação da amida com o anel aromático do ácido hidrocinâmico ou fenilo. Outros sinais que se esperava que

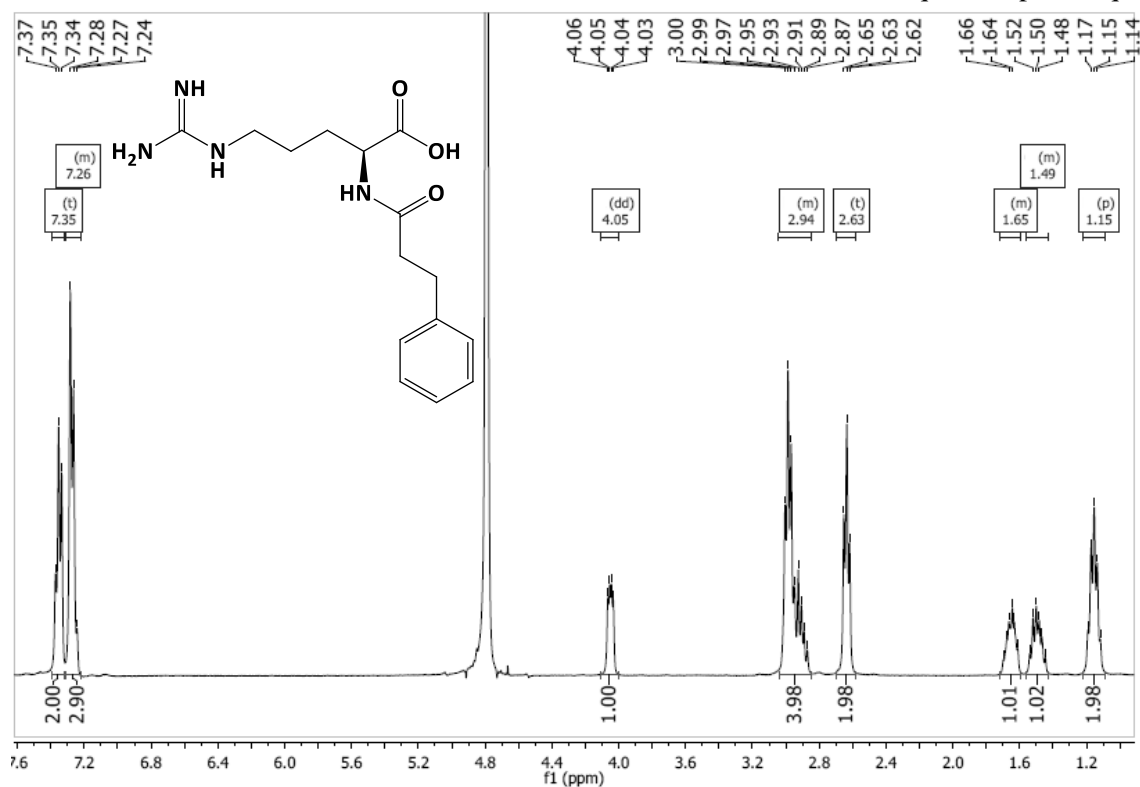


Figura 2.6 Espetro ^1H RMN do composto N^α -(3-fenilpropanil)-L-arginina (**2e**), em D_2O .

identificassem claramente o produto eram o par de tripletos correspondentes à cadeia alquílica do ácido hidrocínâmico. Estes encontravam-se a δ 2,99 e 2,63 ppm, sendo que o primeiro estava parcialmente sobreposto com o sinal dos prótons adjacentes à guanidina.

O composto (**2f**) foi obtido com 81% de rendimento, através do método de conversão do ácido num cloreto de ácido. No espectro de ^1H RMN (Figura 2.8) identificou-se o produto pela presença do sinal duplete de dupletos do próton α da arginina derivatizada, a δ 4,19 ppm. Também se esperava encontrar um singuleto correspondente aos prótons da posição α à amida. Contudo, o sinal apresentou-se como um duplete, resultado do acoplamento geminal. Cheng *et al.*⁷⁰ sintetizaram várias amidas derivadas do ácido fenilacético e em nenhum dos casos obtiveram o sinal com as mesmas características. No seu caso, obtiveram sempre o esperado singuleto. O facto do sinal se apresentar com um aspeto pouco habitual é indicativo de um ambiente químico particular, naquela zona da molécula. Os prótons aromáticos aparentavam ter ambientes químicos muito semelhantes pois não se conseguiam distinguir no espectro. No entanto, a integração do multiplete correspondia a 5 prótons, como era esperado.

O composto (**2g**) foi obtido com 38 % de rendimento por adição direta do fenil cloroformato

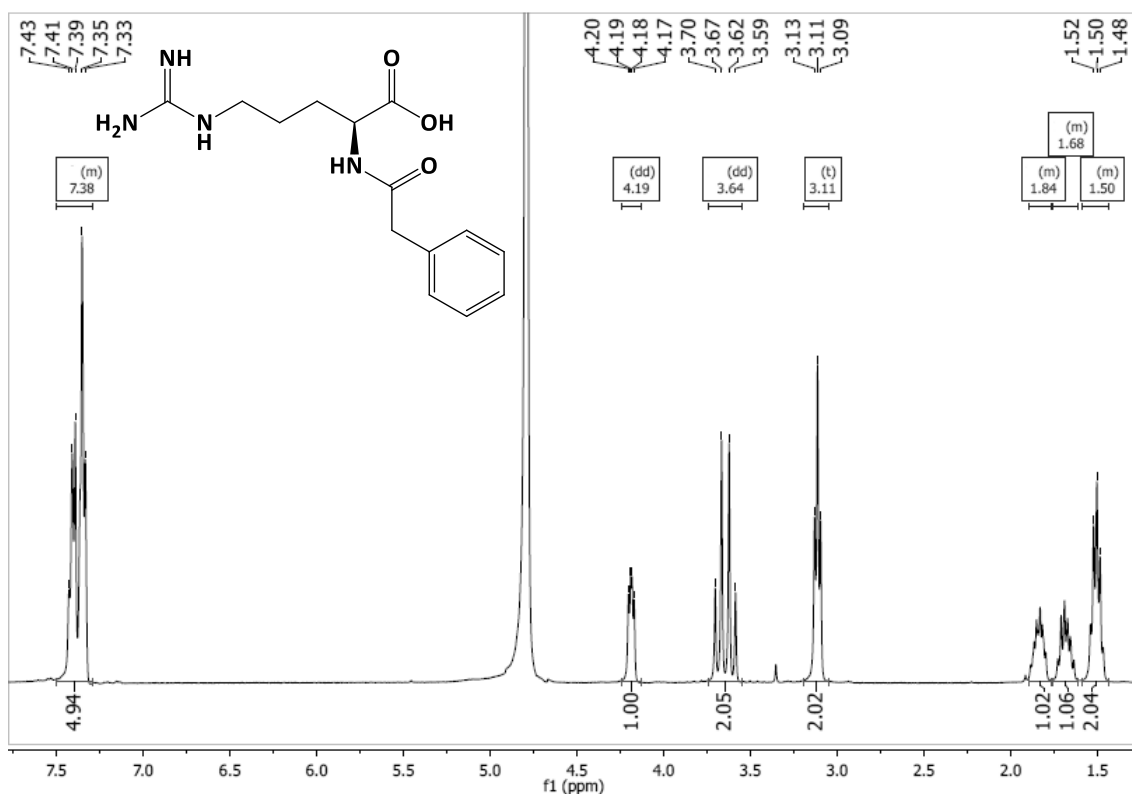


Figura 2.8 Espectro de ^1H RMN do composto N^α -fenilacetil-*L*-arginina (**2f**), em D_2O .

a uma solução aquosa basificada de *L*-arginina. O procedimento descrito no capítulo **IV.2.1.6** foi adaptado de um procedimento desenvolvido por Movnihan e Yu⁷¹ para a síntese de benziloxi-*L*-arginina (Cbz-arginina). Este composto foi identificado no espectro ^1H RMN (Figura 2.9) pelo sinal multiplete a δ 4,09 ppm e pelos prótons aromáticos. O espectro também mostra que o

composto não foi obtido puro, evidenciado pelos sinais a, aproximadamente, δ 6,8 e 3,5 ppm. O baixo rendimento pode estar relacionado com a mesma razão que já foi referida quando se abordou o baixo rendimento obtido para se obter (**2a**), a solução não estava básica o suficiente, pelo que a amina da arginina protonou e ficou impossibilitada de reagir. A base usada foi NaHCO_3 1 M com 4 N de NaOH.

De seguida tentou-se sintetizar dipéptidos a partir de aminoácidos protegidos comerciais

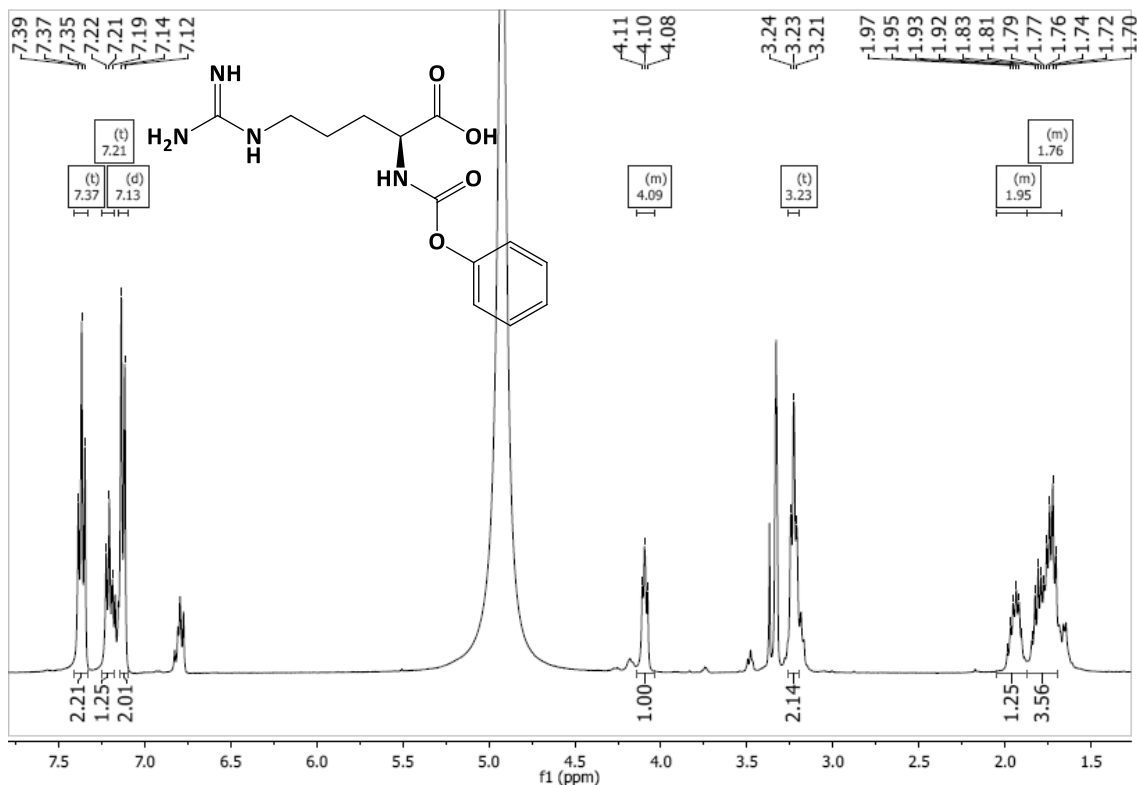


Figura 2.9 Espectro ¹H NMR do composto *N* $^{\alpha}$ -fenoxycarbonyl-L-arginina (**2g**), em CD₃OD.

disponíveis no laboratório.

Tentou-se obter o composto (**2h**) através da reação do aminoácido Fmoc-L-prolina com cloreto de tionilo para formar o cloreto de ácido. A formação do cloreto de ácido da Fmoc-L-prolina já havia sido reportada anteriormente.⁷² A necessidade de ter este aminoácido protegido advém da possibilidade de ocorrerem reações secundárias entre a amina da prolina e o cloreto de ácido formado. Por sua vez, o grupo Fmoc (9-fluorenometoxycarbonyl) é removido, habitualmente, por tratamento com uma base suave, como piperidina.²⁸ Por esta razão, evitou-se usar o CDI, devido à formação de imidazole como produto lateral na reação.

A reação através da formação do cloreto de ácido da Fmoc-L-prolina não foi bem sucedida, dado que nunca se conseguiu identificar o produto pretendido nas frações recolhidas. Nos espectros de ¹H RMN nunca se conseguiu identificar com clareza, na zona de δ 4 ppm, os prótons α de ambos os aminoácidos nem os prótons da cadeia alifática do Fmoc. Por terem ambientes químicos semelhantes, os sinais presentes a este desvio químico encontravam-se muito sobrepostos. Outra

razão que nos levou a crer no insucesso da reação foi a não correspondência na integração entre os prótons das cadeias laterais dos aminoácidos e os prótons aromáticos do Fmoc, que deviam integrar claramente para 8.

Sabe-se que o Fmoc é um grupo sensível à presença de bases, dado que é removido por uma base como piperidina.²⁸ Bodanszky *et al.*⁷³ e Farrera-Sinfreu *et al.*⁷⁴ reportaram reações laterais de remoção do grupo Fmoc por amins primárias e secundárias, como as amins dos aminoácidos glicina, valina e prolina, a amina da cadeia lateral da lisina e até por bases como *N,N*-diisopropiletilamina, uma amina terciária. Por exemplo, após 10h de reação, 50% de Fmoc-*L*-alanina já foi desprotegida na presença de L-Pro-O-*t*Bu.⁷³ Contudo, existe ainda outra razão para o insucesso da reação. Se compararmos os pKa envolvidos dos grupos funcionais presentes na reação com o da piperidina, que segundo Hall⁷⁵ tem um pKa de 11,22, percebemos que a guanidina, que tem um pKa de 13,8,²⁰ pode também ser responsável pela remoção do Fmoc. Jaradat²⁸, no seu artigo de revisão sobre os progressos na síntese de péptidos em fase sólida (*SPPS*), refere que na estratégia de *SPPS* com Fmoc como grupo de proteção da amina é necessário proteger a guanidina da arginina e sugere que tal seja feito com um dos grupos Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetil-benzenosulfonilo, Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) ou Pbf (2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo). A Figura 2.10 mostra o mecanismo geral de remoção do Fmoc com piperidina em que NHR é um resíduo de um aminoácido.

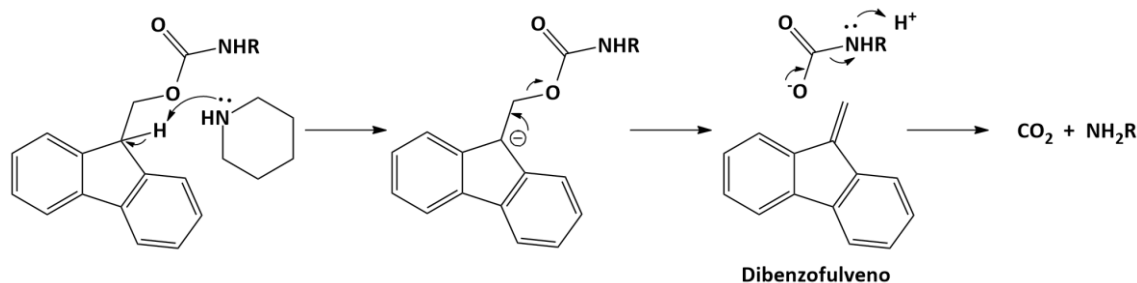


Figura 2.10 Mecanismo de remoção do grupo Fmoc com piperidina. No processo formam-se CO₂, o aminoácido livre, representado por NH₂R, e díbenzofulveno.

Dados os resultados obtidos, considera-se que algo semelhante a este mecanismo acontece com a guanidina da arginina.

Nos espectros obtidos, confirma-se a destruição do Fmoc pois é possível identificar o díbenzofulveno pelo sinal do metileno a δ 6,15 ppm e pela correspondência na integração com os sinais na zona aromática. O díbenzofulveno é conhecido por formar adutos com a piperidina e por poder reagir com amins.

A remoção do Fmoc no decorrer da reação significa que no meio reacional havia L-prolina com a amina livre, o que promove ainda mais a ocorrência de reações laterais, dado que esta pode reagir com o cloreto de ácido de Fmoc-L-prolina. Por outro lado, a remoção do Fmoc pode ter acontecido depois da reação entre a arginina e o cloreto de ácido pelo que se devia procurar nos espectros pelo dipéptido desprotegido. Um dos espectros obtidos indica uma mistura entre dibenzofulveno e o dipéptido, na proporção 0,16:1. O rendimento, calculado por RMN, foi de 8%. O espectro está na Figura 2.11. Os sinais do dibenzofulveno já foram referidos no parágrafo anterior. Quanto ao dipéptido, podemos identificar os sinais correspondentes aos prótons α da arginina e da prolina a δ 4,26 e 3,69 ppm, respetivamente.

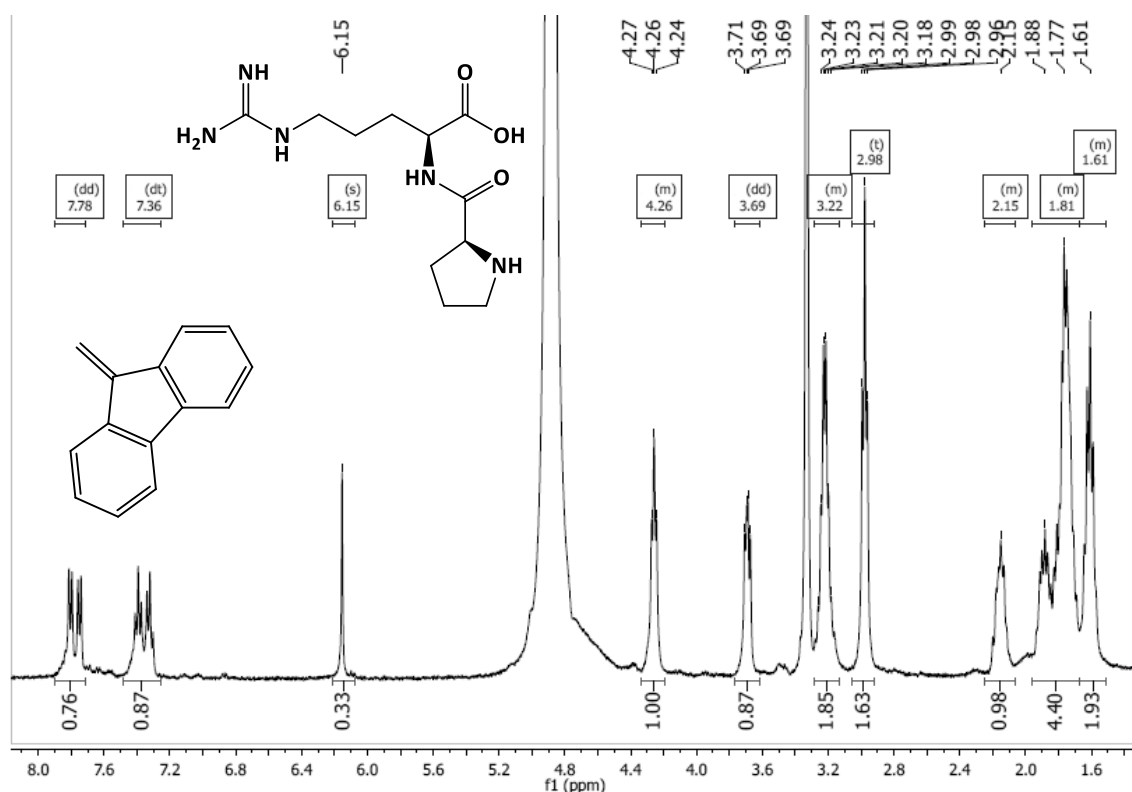


Figura 2.11 Espectro ^1H RMN do dipéptido desprotegido (*S*)-prolin-L-arginina (**2h**), misturado com dibenzofulveno, em CD_3OD .

Tentou-se fazer esta reação com recurso ao reagente de acoplamento DCC para ativar o ácido. Contudo, a reação não foi bem sucedida e nenhum dos produtos, protegido ou não, foi identificado.

Por fim, o último produto derivatizado sintetizado foi o composto (**2i**), um dipéptido de arginina com Boc-L-histidina. Esta reação foi feita com recurso ao CDI como reagente de acoplamento e obteve-se um rendimento de 31%. Não se fez a reação com cloreto de tionilo para formação do cloreto de ácido uma vez que o grupo Boc é intolerante a condições ácidas. No espectro de ^1H RMN (Figura 2.12) é possível identificar o produto pelo sinal desviado do próton α da arginina para δ 4,33 ppm e o sinal do próton α do resíduo de histidina a δ 4,18 ppm e pelos

sinais singletos dos prótons do imidazole a δ 7,73 e 6,97 ppm. A campo alto, identifica-se claramente o singlete correspondente aos 9 prótons do Boc.

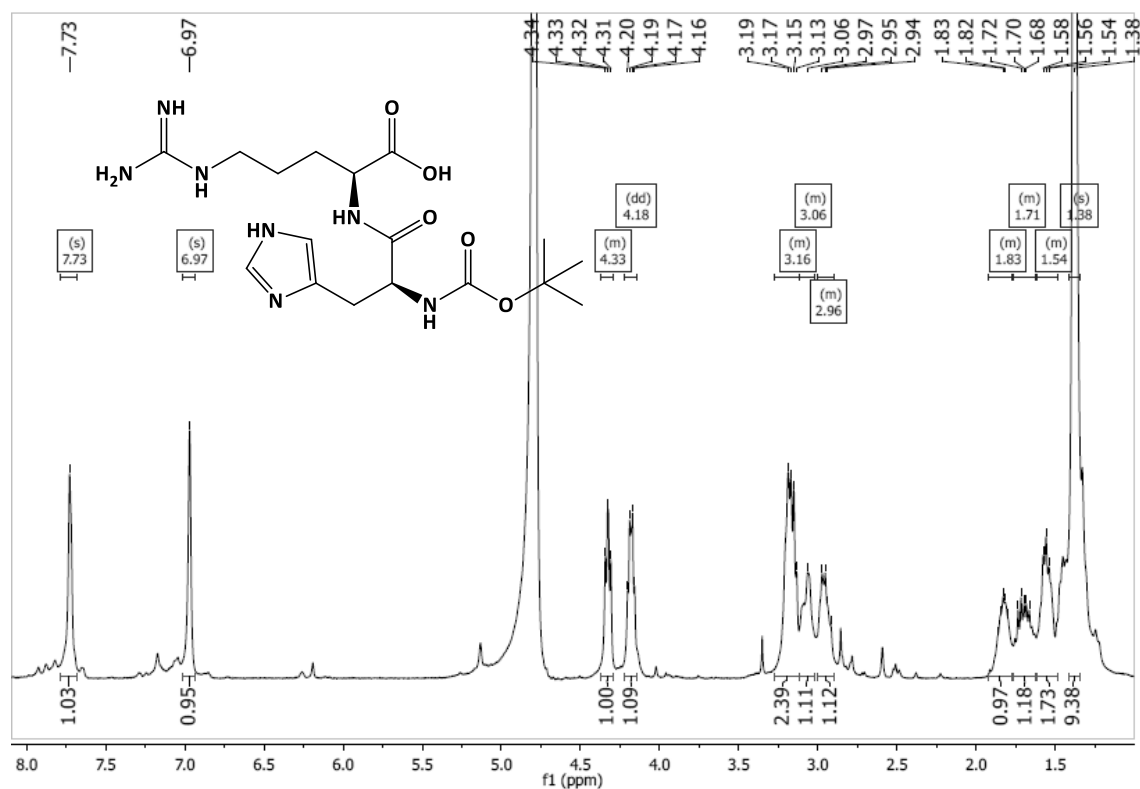


Figura 2.12 Espetro ¹H RMN do composto (S)-2-(*tert*-butoxicarbonil)histidil-L-arginina (**2i**), em D₂O.

II.3. Reações de descarboxilação oxidativa com DIB/I₂

Após a preparação dos derivados *N*-acilarginina, procedeu-se para o segundo passo do plano de síntese, a descarboxilação oxidativa com ciclização intramolecular do resíduo de arginina, formando o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina derivatizado na amina (**3**).

Tal como já foi abordado no capítulo da introdução, existem publicados muitos artigos sobre descarboxilações oxidativas. Já que o objetivo desta tese passa pela descarboxilação de um aminoácido, deu-se, naturalmente, maior relevância aos artigos que versavam sobre métodos de descarboxilação oxidativa de aminoácidos. É importante lembrar que, de acordo com o conhecimento, no momento de escrita desta tese, não existia nenhum artigo que referisse especificamente a síntese do núcleo carboxamidina ou da cernumidina ou de análogos. O método que sintetiza moléculas relativamente semelhantes foi o desenvolvido por Boto *et al.*¹⁷ Por isso, decidiu-se começar por experimentar as condições nele descritas nos derivados de arginina (**2**) que se sintetizou anteriormente.

Neste método, o par oxidante usado é o DIB/I₂, sendo que o DIB é um reagente de iodo hipervalente, I(III). De acordo com Boto,^{17,46} a reação procede através da formação de um radical carboxilo. Ocorre a libertação de CO₂, formando um radical alquilo no carbono α do aminoácido, que origina de seguida um ião acilimínio. Este ião é de seguida capturado intra ou intermolecularmente por um nucleófilo. Um dos substratos usados por Boto e colaboradores é a L-ornitina, com as aminas derivatizadas em metil carbamatos. O produto formado é o resultado da ciclização intramolecular, ou seja, do ataque do azoto da cadeia lateral ao ião acilimínio no carbono α (Figura 1.13b). O que se pretende, no caso do derivado de arginina, é o ataque do azoto da guanidina, adjacente ao carbono δ , ao carbono α após se formar o ião acilimínio (Figura 2.13). Repare-se que neste mecanismo perde-se o carbono assimétrico do aminoácido quando se liberta CO₂. Espera-se que o produto final (**3**) seja um racemato.

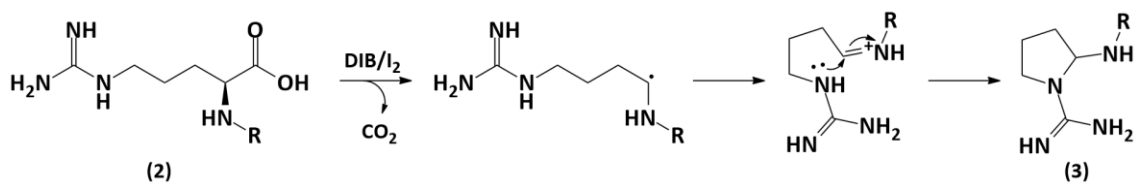


Figura 2.13 Descarboxilação oxidativa do derivado de *L*-arginina (**2**) com DIB/I₂ e ciclização intramolecular, formando o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina e o respetivo produto (**3**).

Começou-se por experimentar a reação com o substrato mais simples, a *N*^α-benzoílo-L-arginina (**2a**). Foram realizados vários ensaios no sentido de otimizar o método e o rendimento obtido. Os ensaios e as respetivas condições estão discriminados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 Resumo dos vários ensaios para a obtenção de (**3a**). Os ensaios foram feitos de acordo com o procedimento geral, descrito em 2.2.1.

Entrada	Eq de DIB/I ₂	Solvente	T (°C)	t _{reação} (h)	η (%)
1	2:0,5	DCM	T.a.	48	Vestigial
2	2:0,5	DMF + 1,5 eq NaOH	T.a.	18	-
3	4:1	CH ₃ CN	Refluxo	56	Produto desconhecido
4	4:1	DCM	T.a.	1,5	-
5	4:1	DCM	Refluxo	48	7% ^a
6	4:1	DMSO	T.a.	48	-
7 ^b	2:0,5	DCM	T.a.	24	Vestigial

T.a. é temperatura ambiente. **a.** Rendimento calculado por RMN. **b.** Reação feita com exposição à luz visível.

Estas reações adquiriam cores fortes quando se adicionava o iodo à reação. O primeiro método de monitorização do progresso da reação era, por isso mesmo, o visual. Ao longo do tempo verificou-se que ocorria uma alteração ou perda da cor da reação, indicando do consumo do I₂ na reação. O segundo método era a *TLC*, onde se pretendia monitorizar o consumo do reagente de partida (**2**) pelo desaparecimento da mancha correspondente. Como o produto ainda não tinha sido sintetizado em quantidades apreciáveis, a sua identificação na *TLC* era dificultada pois não se sabia que mancha correspondia ao produto, nem se o mesmo era mais ou menos polar que o reagente de partida. Na revelação das *TLC* utilizaram-se reagente de ninidrina e reagente de Dragendorff. No subcapítulo anterior foi dito que os produtos (**2**) adquiriam cor amarela com ninidrina pelo que este era um bom revelador para se verificar o desaparecimento da mancha do reagente. Já o reagente de Dragendorff seria muito útil para verificar a presença do produto **3** o qual adquiria uma cor laranja muito intensa com este revelador o que não se verifica com o material de partida, o composto **2**.

Analisando a Tabela 2.4, das várias condições testadas nos ensaios, as que produziram melhores resultados foram as que tinham DCM como solvente e feitas a refluxo. Esta condição em conjunto com o uso de 4:1 eq de DIB/I₂ parecem produzir um aumento na velocidade da reação (Tabela 2.4, entrada 5). Quando isto não se verificou, conseguiu-se identificar o produto no espectro de ¹H RMN mas não em quantidades apreciáveis (Tabela 2.4, entrada 1 e 7). Este último ensaio foi feito com elevada exposição à luz solar. No entanto, esta não parece ter contribuído significativamente para a eficácia da reação.

O espectro ¹H RMN obtido no (Tabela 2.4, entrada 5) contém uma mistura entre o reagente de partida (**2a**) e o produto (**3a**), na proporção 5,5:1. Por uma questão de simplicidade, apenas

estão assinalados no espectro (Figura 2.14) os desvios químicos dos prótons correspondentes a **(3a)**.

Após ocorrer ciclização, o próton correspondente ao próton α em **(2a)** sofreu um desvio considerável para campo baixo e surge a δ 5,77 ppm. Também, os antigos prótons adjacentes ao azoto da guanidina já não são equivalentes, aparecendo agora a campo mais baixo, δ 3,49 e 3,33 ppm, em resultado da formação do anel de pirrolidina. Os prótons aromáticos encontram-se sobrepostos com os de **(2a)**, mas é possível observar um ligeiro desvio para campo alto dos prótons *orto*, a δ 7,63 ppm. Os restantes prótons da cadeia lateral sofreram um desvio para campo baixo, surgindo a δ 2,19 e 2,01 ppm.

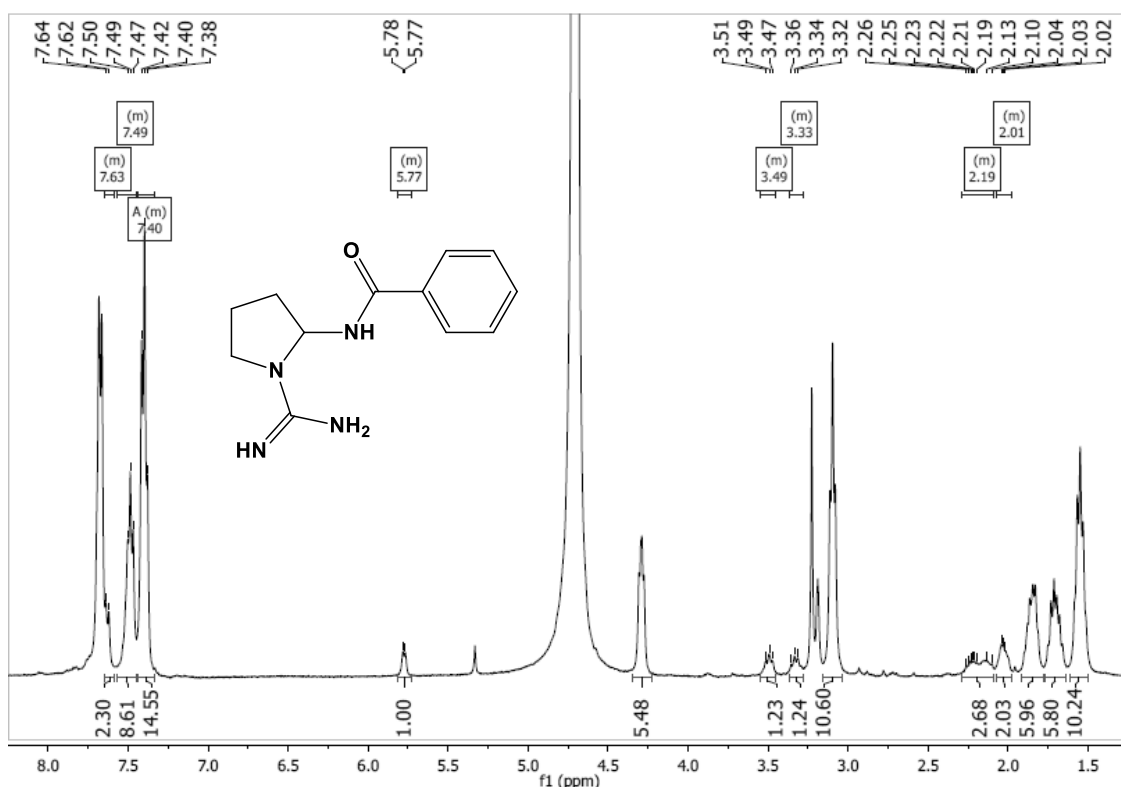


Figura 2.14 Espectro de ^1H RMN, em D_2O , da mistura obtida na Entrada 5, composta por N^α -benzoyl-L-arginina (**(2a)**) e N -(1-carbamimidopirrolidin-2-il)benzamida (**(3a)**). Os picos assinalados e os multipletos correspondem a **(3a)**.

Todos os outros ensaios realizados noutros solventes não produziram o resultado esperado. O ensaio em acetonitrilo (Tabela 2.4, entrada 3) produziu outro composto desconhecido que não era **(3a)**.

Desde logo o solvente da reação representou um problema. Os produtos derivados **(2a)** são polares e solúveis apenas em água e parcialmente solúveis em metanol. Em todos os ensaios, a mistura reacional era uma solução heterogênea, dado que nunca ocorria a total dissolução da arginina derivada. Após se parar as reações, existia sempre um precipitado que se verificou ser maioritariamente reagente de partida. Contudo por *TLC*, a reação aparentava ser completa. A reação não pode ser realizada em solventes próticos devido à labilidade do DIB. Assim, esta

reação estava limitada a solventes não nucleofílicos (sempre secos). Os reagentes de iodo hipervalente contêm um átomo de iodo muito eletrofílico, assim como excelentes grupos de saída, o que torna estes reagentes particularmente suscetíveis a ataques nucleofílicos.⁷⁶

Os rendimentos obtidos eram muito baixos quando comparados com os de Boto *et al.*, que se situavam perto de 90%.¹⁷ Assim decidimos aproximar o nosso substrato do derivado de L-ornitina utilizado por eles. Nesse sentido, sintetizou-se o derivado (**2g**), *N*^α-fenoxycarbonil-L-arginina, e aplicou-se as condições descritas na Tabela 2.4, entrada 1 e 5. As condições do segundo ensaio (DCM a refluxo) permitiram obter o produto (**3g**) com 15% de rendimento. Contudo o espectro obtido mostrou que existia contaminação da amostra com produtos desconhecidos. O espectro de ¹H RMN está na Figura 2.15. Neste, tal como no anterior, identificou-se o sinal do próton α a δ 5,59 ppm, a campo mais alto que o anterior, devido ao derivado ser um carbamato e não uma amida. A presença dos sinais dos prótons adjacentes à guanidina, a δ 3,62 e 3,44 ppm, indicando que estes eram não equivalentes confirmaram a ciclização do resíduo de arginina ao núcleo pirrolidina.

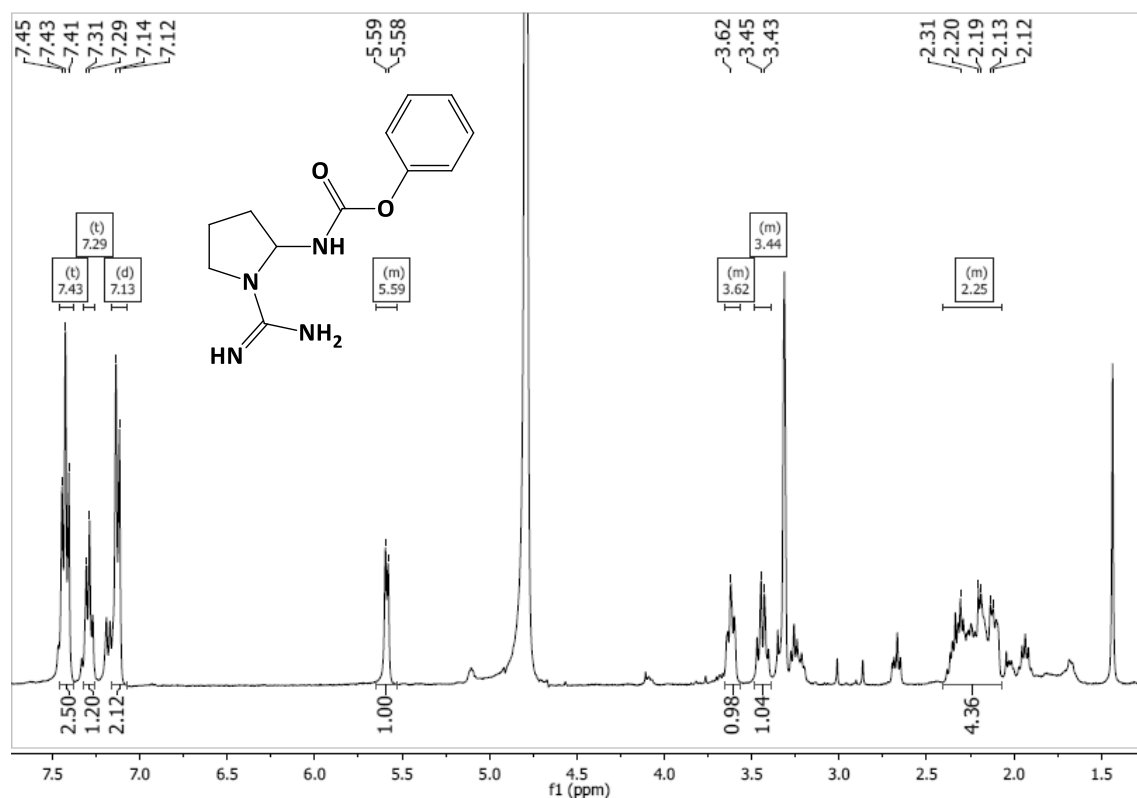


Figura 2.15 Espectro ¹H RMN do composto fenil (1-carbamimidopirrolidin-2-il)carbamato (**3g**), em D₂O.

Minakata *et al.*⁷⁷ estudaram o mecanismo desta reação. Embora no seu artigo, eles se debrucem sobre a descarboxilação oxidativa de ácidos alifáticos com DIB/I₂, o mecanismo no início da reação pode ser extrapolado para o caso aqui em estudo uma vez que não depende da presença ou não de outros grupos funcionais na molécula. Eles propõem que o ácido carboxílico forma um intermediário com o DIB, libertando-se acetato. Por outras palavras, uma troca de ligando no DIB. De seguida, o I₂ decompõe o intermediário, formando-se uma espécie hipoiodeto de acilo, RCO₂I, que sofre fotodecomposição sob luz visível. O produto formado, que segundo Boto é um radical alquilo¹⁷ e Minakata um iodeto de alquilo,⁷⁷ sofre as respetivas reações dependendo da molécula e das condições usadas por cada um dos autores. Uma reprodução do mecanismo proposto por Minakata e colaboradores está na Figura 2.16.

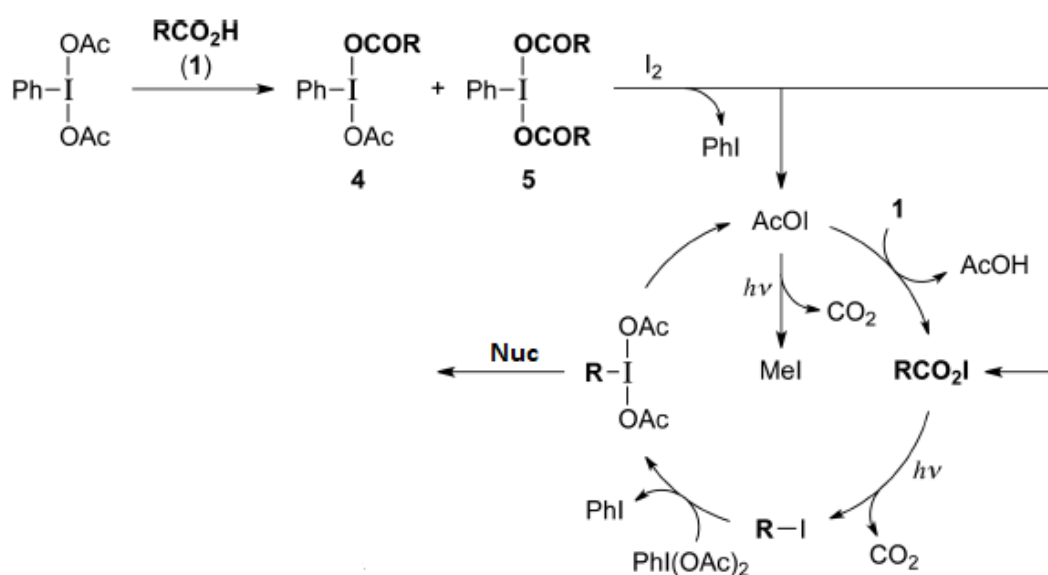


Figura 2.16 Reprodução do mecanismo proposto para a reação de descarboxilação oxidativa com DIB/I₂ proposta por Minakata *et al.*⁷⁷. A parte após o ataque do nucleófilo foi omitida uma vez que era específica deste artigo e este foi substituído por um nucleófilo geral “Nuc”. No caso do artigo, “Nuc” era CH₃CN, no caso aqui em estudo seria o azoto da guanidina de modo a que ocorresse ciclização para formar o núcleo carboxamidina. 1 é o ácido carboxílico, que seria o resíduo do aminoácido L-arginina no caso aqui em análise. 4 e 5 são intermediários que se podem formar quando ocorre a substituição do acetato pelo ácido.

Olhando para o mecanismo, a reação deveria ser eficiente com os reagentes (2). Uma possível razão para isto não acontecer é a insolubilidade do material de partida nos solventes usados.

Apesar de não existirem evidências de reações laterais do DIB, por exemplo com a guanidina ou com o azoto da amida, elas são possíveis. Antonchick *et al.*⁷⁸ e Wang *et al.*⁷⁹ reportam sínteses, tendo DIB como oxidante, em que iminas e amidas, respetivamente, participam em troca de ligandos atacando o DIB.

O mecanismo também aponta para a formação de outro produto lateral, iodometano, um reagente metilante. Um possível produto que poderia ser detetado no ¹H RMN seria o metil éster de (2) ou a alquilação do azoto da guanidina. A fotodecomposição de AcOI para formar MeI,

libertando CO₂ pode ser tornada irrelevante para o sucesso da reação usando uma quantidade estequiométrica de I₂, o que foi feito no ensaio descrito na Tabela 2.4, entrada 5. Isto significa que a formação de MeI não constitui uma razão para o insucesso da reação.

No grupo de investigação foi feita uma reação de descarboxilação oxidativa de (**2a**) com um protocolo desenvolvido noutro artigo de Minakata *et al.*⁸⁰, semelhante ao descrito na Tabela 2.4, entrada 5, em que se utilizou como solvente uma mistura de AcOH/DCM 3:1. A reação decorreu sob refluxo durante 3 dias. Surpreendentemente, o rendimento obtido foi de 59%. Minakata *et al.*⁸⁰ referem que na presença de AcOH a formação do intermediário entre o ácido e o DIB é desfavorecida (princípio de Le Chatelier) e, em contrapartida, o DIB é decomposto pelo I₂ formando um hipiodeto de acetilo, AcOI. Este por sua vez, forma o hipiodeto de acilo, RCO₂I, e a reação prossegue como já foi descrito anteriormente no mecanismo da Figura 2.16. Uma reprodução do mecanismo proposto por Minakata e colaboradores para este caso concreto está na Figura 2.17.

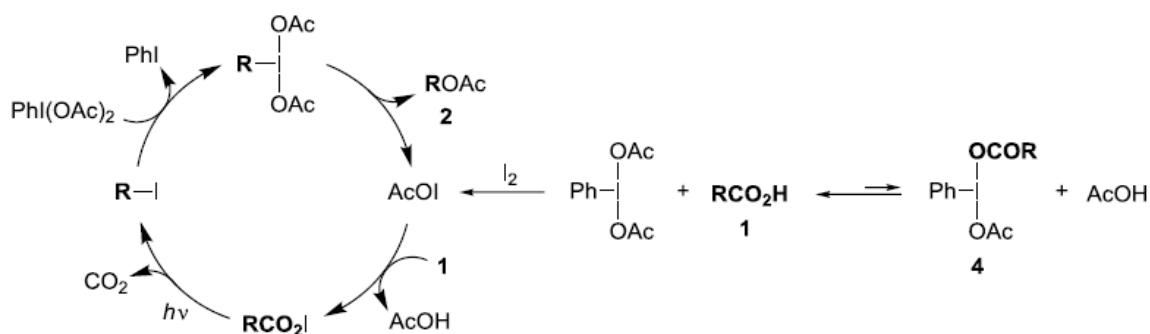


Figura 2.17 Reprodução do mecanismo proposto por Minakata *et al.*⁸⁰ para a reação com o DIB, tendo como solvente uma mistura de DCM/AcOH. A formação de **4** é tanto mais desfavorecida quanto maior a quantidade de AcOH usada

O resultado obtido na reação em DCM/AcOH 1:3 sugere que a formação de AcOI é essencial para o sucesso da reação. Isto pode não ter acontecido nos ensaios descritos na Tabela 2.4, daí os fracos rendimentos. Esta mistura de solventes trouxe outra vantagem que foi a solubilização do reagente (**2a**), que pode também ter sido um fator de distinção para o sucesso desta reação.

Fez-se uma reação de descarboxilação oxidativa com DIB/I₂ para o substrato *N*^α-cinamoíl-*L*-arginina (**2c**). Contudo, esta não foi bem sucedida pois não se conseguiu identificar o sinal identificador do produto a, aproximadamente, δ 5,8 ppm no espetro ¹H RMN do crude reacional.

Para sumarizar este subcapítulo, com base nos mecanismos de Minakata *et al.* e os resultados obtidos, a reação de descarboxilação oxidativa dos derivados de arginina (**2**) com DIB/I₂ não produziu resultados satisfatórios, exceto quando usada a mistura de solventes DCM/AcOH 1:3. A formação do hipiodeto de acetilo, AcOI, aparenta ser relevante para o sucesso da reação.

Do ponto de vista da química sustentável, esta reação apresenta uma séria desvantagem dada a quantidade de resíduos produzida.

II.4. Reações de descarboxilação oxidativa com NBS

No rescaldo dos resultados negativos obtidos com DIB/I₂, decidiu-se experimentar um caminho alternativo para se obter os compostos (3). Em vez de se descarboxilar e oxidar os derivados de arginina (2), optou-se por descarboxilar e oxidar a *L*-arginina (1) no sentido de se obter o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina. Este reage depois com um cloreto de acilo para formar o composto (3) (Figura 2.18).

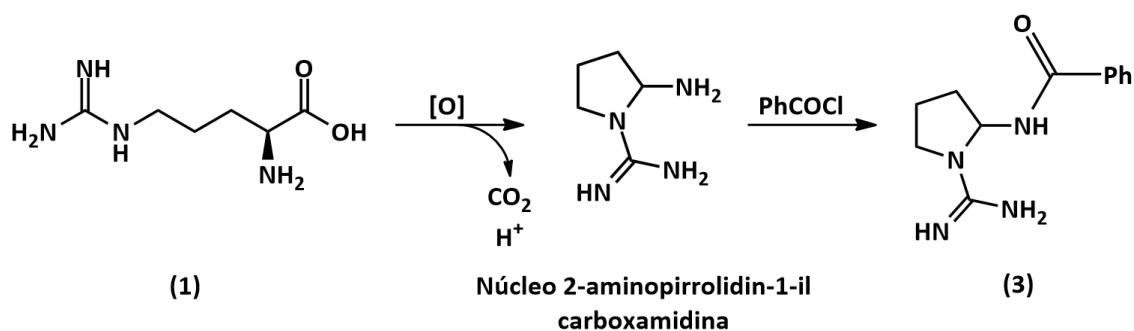


Figura 2.18 Síntese alternativa para obtenção do composto (3), começando pela descarboxilação oxidativa de *L*-arginina e reação posterior com cloretos de acilo.

Para realizar a descarboxilação do aminoácido, de entre alguns dos métodos referidos no subcapítulo **1.5 Descarboxilação de aminoácidos**, optou-se pelo método de Laval e Golding.⁵³ Este método usa NBS para efetuar a descarboxilação de aminoácidos. Os autores obtêm nitrilos como resultado da descarboxilação dos aminoácidos. No nosso caso, esperávamos conseguir obter a ciclização do resíduo de arginina descarboxilada.

Na Tabela 2.5 estão descritas as condições dos vários ensaios efetuados. O cloreto de ácido utilizado foi o cloreto de benzoílo (4a), dando o produto (3a).

Tabela 2.5 Síntese dos ensaios realizados para a obtenção de (3a), tendo NBS como oxidante.

Entrada	Eq de NBS	Solvente/ volume	t _{reação} (h) com NBS	t _{reação} (h) com (4a)	η (%)
1	3	H ₂ O/5mL	0,1	18	-
2	3 ^a	H ₂ O/5 mL	2 ^b	18	-
3 ^c	1,5	H ₂ O/0,5 mL	6	-	-
4 ^c	3 ^a	DMF/5mL	72 ^b	-	-
5 ^c	3	CH ₃ CN/5mL	0,5	-	-

a. Adicionou-se 1,5 eq de NBS primeiro e como a reação não ficou completa, adicionaram-se mais 1,5 eq. b. Tempo de reação total. c. Não se adicionou o cloreto de benzoílo.

Nenhum dos ensaios produziu os resultados esperados. A monitorização da reação também se mostrou difícil uma vez que todos os produtos eram muito polares e com *R_f* próximo de zero, tal como a arginina.

Os resultados obtidos num dos ensaios (Tabela 2.5, entrada 2) indicou pelo espectro de ^1H RMN (Figura 2.19) a presença de duas moléculas, uma em quantidade muito maior que a outra. Começando pela molécula em maior quantidade, esta era caracterizada por 3 sinais a δ 3,37, 2,62 e 2,00 ppm, os dois primeiros tripletos e o terceiro um quintupeto. Tendo em conta os desvios químicos, este conjunto de sinais é típico de estruturas $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ lineares adjacentes a heteroátomos e/ou grupos funcionais. O desvio químico do tripleto a campo mais baixo indica que este está adjacente a um azoto. Estas características indicavam que o produto maioritário continha a cadeia lateral da arginina e não estava ciclizado. O produto minoritário apresentava um sinal multipletto a δ 5,5 ppm, com aspeto semelhante ao que se obteve com os produtos (3a) e (3g) no subcapítulo anterior. Os restantes sinais de baixa intensidade a campo mais alto indicavam que estávamos perante um produto ciclizado e pela integração dos mesmos, viu-se que correspondiam à mesma molécula que o sinal a δ 5,5 ppm. Para se confirmar a estrutura destas moléculas, recorreu-se a espectrometria de massa. O espectro de *LC-MS* confirmou que o produto maioritário era o nitrilo e o minoritário o hemiaminal cíclico (estruturas sobre o espectro de ^1H RMN em baixo), indicando neste último caso que ocorreu a formação de um aldeído que foi atacado pelo azoto da guanidina formando o produto ciclizado. Os picos no espectro de massa indicavam a razão a m/z 127 e 130, respetivamente para o $[\text{M}+\text{H}]^+$ de ambos os compostos. O espectro de massa encontra-se no anexo A1.

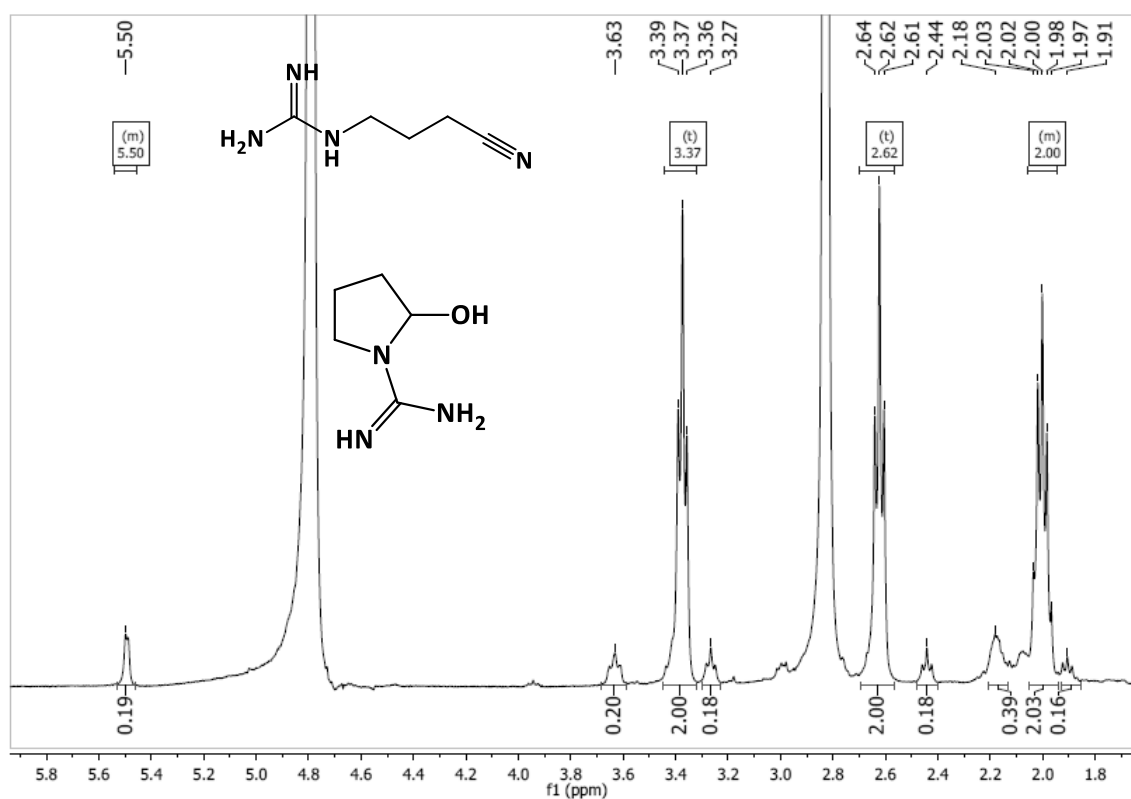


Figura 2.19 Espectro ^1H RMN, em D_2O , dos compostos obtidos na entrada 2.

Para evitar a formação destes produtos, tentou usar-se o mínimo de água (Tabela 2.5, entrada 3) ou fazer a reação noutro solvente ((Tabela 2.5, entrada 4 e 5). Todavia, os resultados não foram satisfatórios.

Gopalakrishnan e Hogg⁸¹ estudaram a cinética da reação de descarboxilação de aminoácidos com NBS e propuseram um mecanismo para a reação. O seu estudo indica que o nitrilo correspondente ao aminoácido é o produto maioritário da reação e o aldeído o minoritário, o que está completamente de acordo com os resultados obtidos. A reação tem de ser feita, forçosamente, em água uma vez que é necessária a formação de um ião BrH_2O^+ . O mecanismo encontra-se na Figura 2.20.

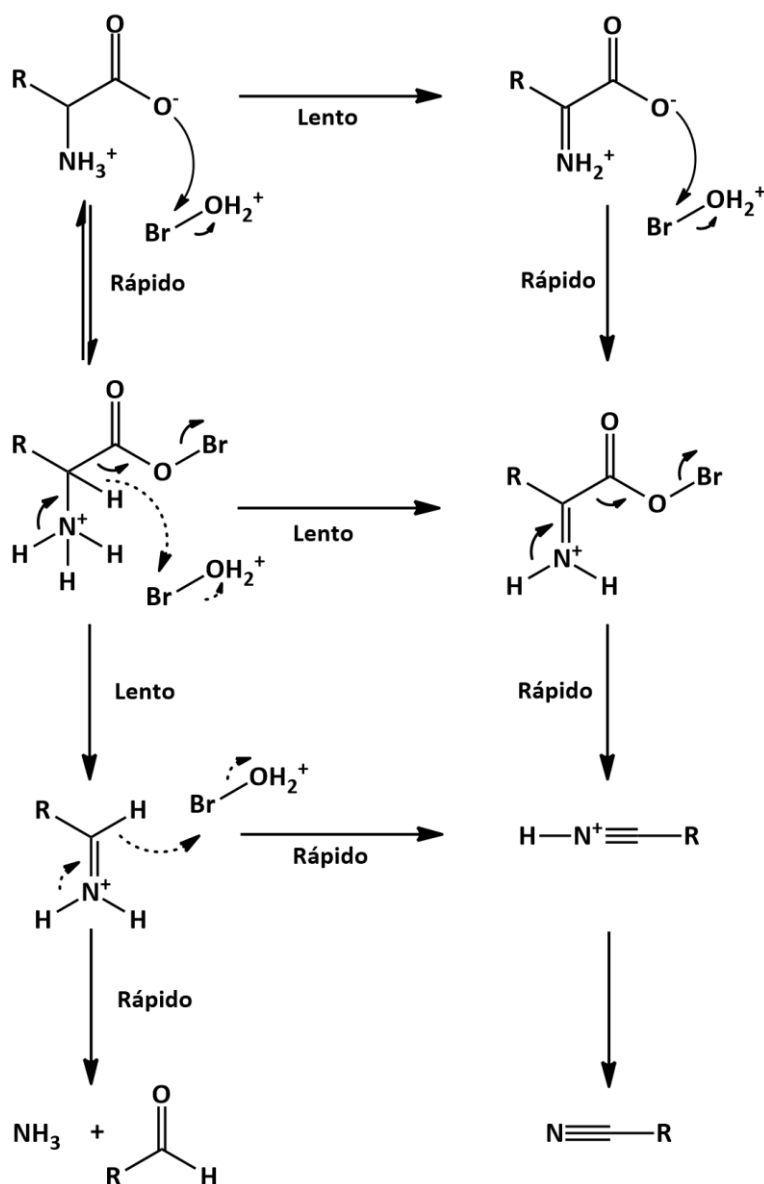


Figura 2.20 Mecanismo proposto por Gopalakrishnan e Hogg⁸¹ para a descarboxilação de aminoácidos com NBS. As setas a tracejado indicam as reações de abstração de hidreto por parte do oxidante $[\text{BrH}_2\text{O}]^+$.

O mecanismo da Figura 2.20 permite concluir que a formação de nitrilo é dependente da concentração da espécie oxidante BrH_2O^+ que por sua vez é dependente do pH. Os autores referem

que mesmo a pH básico, a formação de nitrilo é favorecida. O mecanismo proposto também sugere que o uso de apenas 1 eq de NBS permite alcançar o íão imínio. Portanto, fazendo a reação com 1 eq de NBS e aquecimento pode conduzir à formação do núcleo carboxamidina, possivelmente, em par com o hemiaminal proveniente do aldeído.

Experimentou-se fazer a descarboxilação com NBS nos derivados de *L*-arginina (**2**). Verificou-se que a reação não ocorria com estes substratos.

Dado o insucesso obtido, voltou-se ao plano inicial de descarboxilar e oxidar os derivados de arginina (**2**) com outros oxidantes.

II.5. Reações de descarboxilação oxidativa com $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e CuSO_4

Após os resultados insatisfatórios obtidos nos métodos anteriores, decidiu-se recorrer a um oxidante mais forte. Stewart *et al.*⁵⁴ aplicaram o par $\text{AgNO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a aminoácidos pela primeira vez e Anderson e Kochi⁵⁵ esclareceram a cinética e o mecanismo desta reação, atribuindo o poder oxidante ao ião Ag^{2+} metaestável, que se formava *in situ* na presença de $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$. O ião Ag^{2+} pode ser capturado e estabilizado formando um sal com picolinato.⁵⁷ Os mecanismos propostos para a descarboxilação oxidativa de aminoácidos encontram-se nas Figuras 1.18 e 1.19.

Primeiro, decidiu-se começar por experimentar o picolinato de Ag(II) . Este foi sintetizado de acordo com Clarke *et al.*⁸² O método descrito em **IV.3.4** não produziu resultados satisfatórios na síntese de **(3a)**.

Optou-se então por recorrer ao par $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ para fazer a descarboxilação oxidativa. Adaptou-se o procedimento de Silverman e Zelechonok,⁵⁸ fazendo a reação apenas em água e com os equivalentes descritos no ensaio da Tabela 2.6, entrada 1.

Dado que se fizeram muitos ensaios com vários substratos **(2)**, doravante cada ensaio será denominado pela tabela em que é apresentado. Por exemplo, os ensaios com *N*^α-benzoil-L-arginina **(2a)** estão na Tabela 2.6.

Em comparação com o método do DIB/I_2 , estas reações são muito mais rápidas e têm a vantagem de poder ser feitas em água, o que se adequa muito aos substratos **(2)**. Todos os reagentes usados são solúveis em água. Em termos das *TLC* destas reações, identificou-se no UV (254 nm) a presença de uma mancha triangular ligeiramente mais polar que os materiais de partida. A revelação das *TLC* com reagente de Dragendorff provou ser extremamente eficaz uma vez que esta mancha produzia uma cor laranja muito intensa.

Tabela 2.6 Síntese dos métodos usados para a obtenção de (3a). Todos os ensaios feitos de acordo com o procedimento geral em 2.2.1, com ou sem Cu(II). A concentração de (2a) é constante em todos os métodos, 0,036M, exceto nos ensaios referidos na entrada 11 e 12.

Entrada	Eq de AgNO ₃ /(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Eq de CuSO ₄	Solvente	T (°C)	t _{reação} (h)	η (%)
1	0,1:1,2	-	H ₂ O	T.a.	3	39 ^g
2	0,2:1,2	-	DMF	T.a.	>24	- ^f
3	0,25:1,2 ^a	-	H ₂ O	T.a.	<i>Overnight</i>	32 ^g
4	0,15:1,2 ^a	-	AcOH	T.a.	>96	- ^f
5	0,15:0,5	-	H ₂ O	T.a.	24	- ^f
6 ^b	0,15:1,5	-	H ₂ O	T.a.	1	29 ^g
7	0,15:3	0,2	H ₂ O	T.a.	3	- ^f
8	0,15:1,5	-	MeOH	T.a.	48	- ^h
9	0,15:1,5	-	AcOH/H ₂ O 1:1	T.a.	20	- ⁱ
10 ^c	0,15:1,5	-	H ₂ O	T.a.	40	- ^h
11 ^d	0,15:1,5	-	H ₂ O	T.a.	3	51 ^g
12 ^d	0,15:1,5	1	H ₂ O	T.a.	3	76 ^g
13 ^e	0,15:1,5	1	H ₂ O	60	0,5	78 ^g
14	0,15:1,5	-	H ₂ O	60	<i>Overnight</i>	83 ^g
15 ^e	0,15:1,5	1	H ₂ O	60	0,5	72

T.a. é temperatura ambiente. **a.** Adicionou-se mais 1 eq de (NH₄)₂S₂O₈. **b.** Usou-se Ag₂O em vez de AgNO₃. **c.** Usou-se Oxone em vez de (NH₄)₂S₂O₈. **d.** Solução do substrato (2a) com o dobro da concentração. **e.** As reações nas entradas 13 e 15 diferem na ordem de adição dos reagentes. **f.** Mistura complexa de produtos. **g.** Rendimento calculado por RMN. **h.** Recuperação do material de partida. **i.** Mistura com produto desconhecido maioritário.

O resultado promissor na descarboxilação oxidativa de (2a) levou ao estudo, nestas condições reacionais, da descarboxilação dos substratos (2b) e (2c), a *N*^α-*p*-metoxibenzoíl-L-arginina e a *N*^α-cinamoíl-L-arginina, respetivamente. Os dados relativos aos vários ensaios encontram-se nas Tabelas 2.7 e 2.8.

A análise do espectro de ¹H RMN do crude da mistura reacional (Tabela 2.6 entrada 1) revelou que o produto (3a) era maioritário. Contudo, apesar das várias purificações feitas, não foi possível obtê-lo puro, por existir outro produto presente que coeluiu com (3a) que se veio a verificar corresponder ao composto imida (5a) (Figura 2.21).

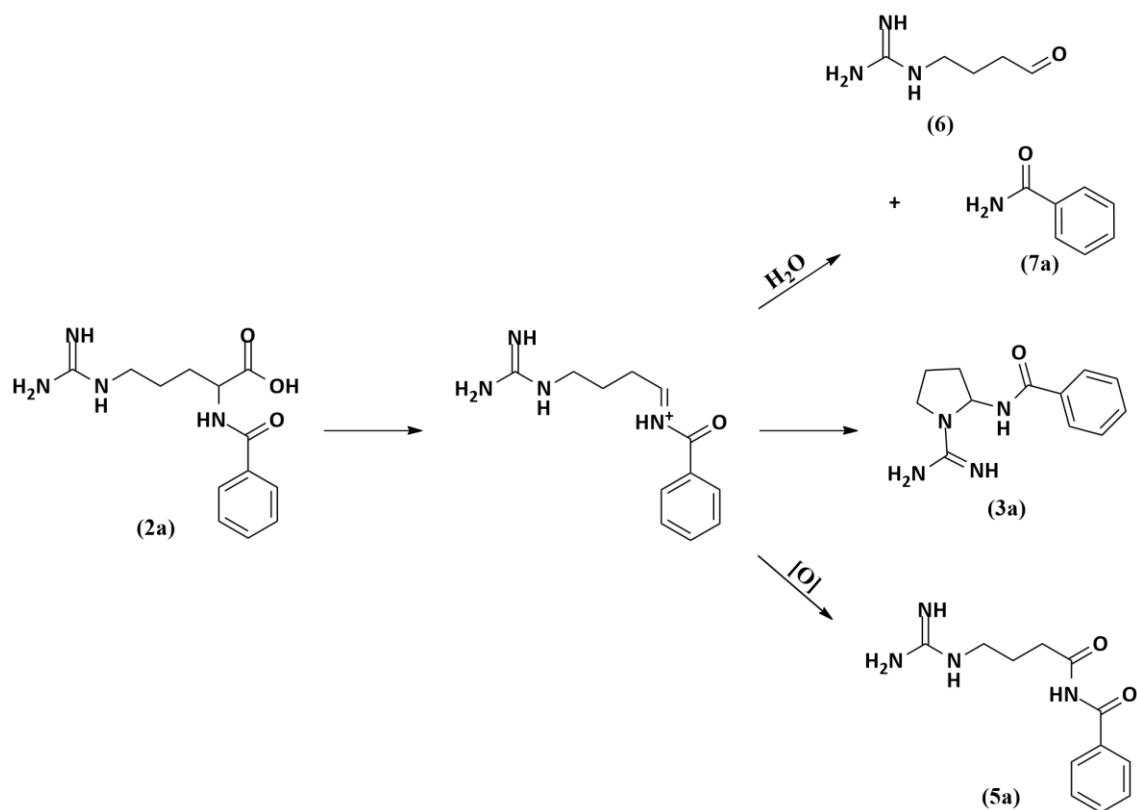


Figura 2.21 Produtos obtidos na reação de descarboxilação oxidativa de (2a). A imida (5a) coelui com o produto (3a). O aldeído (6) e a amida (7a) são os produtos de hidrólise e clivagem oxidativa do intermediário acilímínio.

Tabela 2.7 Síntese dos ensaios para a obtenção de (3b). As reações foram realizadas de acordo com o procedimento geral.

Entrada	Eq de $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Eq de CuSO_4	Solvente	T (°C)	$t_{\text{reação}}$ (h)	η (%)
1	0,15:1,2	-	H_2O	T.a.	3	21 ^a
2	0,15:1,5	1	H_2O	60	0,5	80
3	0,15:1,5	-	H_2O	60	0,5	-

T.a. é temperatura ambiente. ^a Rendimento calculado por RMN.

Quando se procedeu à descarboxilação oxidativa do composto (2c), em nenhuma das condições experimentais testadas (Tabela 2.8) foi possível obter o produto esperado (3c) uma vez que não se identificava o sinal do próton α por volta de δ 5,8 ppm no espectro de ^1H RMN do crude reacional. Este espectro, acompanhado pela observação da *TLC*, indicavam que a reação com este substrato era muito mais suja que as anteriores.

Tabela 2.8 Síntese dos ensaios usados para a obtenção de (**3c**). As reações foram realizadas de acordo com o procedimento geral. T.a. é temperatura ambiente. Em nenhum dos métodos se conseguiu obter o produto (**3c**).

Entrada	Eq de AgNO ₃ /(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Eq de CuSO ₄	Solvente	T (°C)	t _{reação} (h)	η (%)
1	0,15:1,2	-	H ₂ O	T.a.	3	a
2	0,15:1,5	1	H ₂ O	60	5	a
3	0,15:1,5	-	H ₂ O	60	0,5	a
4	0,15:3	-	H ₂ O	T.a.	4	a
5	0,5:1,5	-	H ₂ O	T.a.	4	a

a. Mistura complexa.

O espectro de ¹H RMN de uma das frações recolhidas na purificação do ensaio descrito na Tabela 2.7, entrada 1 ajudou a elucidar o que estava a ocorrer durante estas reações e que produtos se formaram. O espectro está na Figura 2.22. Por interpretação do espectro, conclui-se que existem 2 produtos na amostra. O maioritário é o produto (**3b**) assinalado pelo multipeto característico a δ 5,83 ppm e pelos sinais a δ 3,61 e 3,43 ppm que indicam a presença do núcleo pirrolidínico. O outro produto (**5b**) apresenta o esqueleto linear característico da arginina, informação que é dada pelos sinais a δ 3,24, 2,67 e 1,91 ppm, os dois primeiros tripletos e o terceiro um quintupeto, típicos de uma estrutura -CH₂-CH₂-CH₂- linear ligada a heteroátomos e/ou grupos funcionais, como já foi apontado no subcapítulo anterior. A proporção obtida dos dois produtos foi de 1:0,33.

A espetrometria de massa de uma amostra da reação de descarboxilação do substrato (**2a**) (Tabela 2.6, entrada 1) contendo os dois produtos **3a** e **5a** confirmou tratar-se de um produto de dupla oxidação, contendo uma imida, sinal a *m/z* 249 [M+H]⁺ em modo positivo e 247 [M-H]⁻ em modo negativo. Também neste espectro foi possível identificar a *m/z* 233 [M+H]⁺ o composto (**3a**).

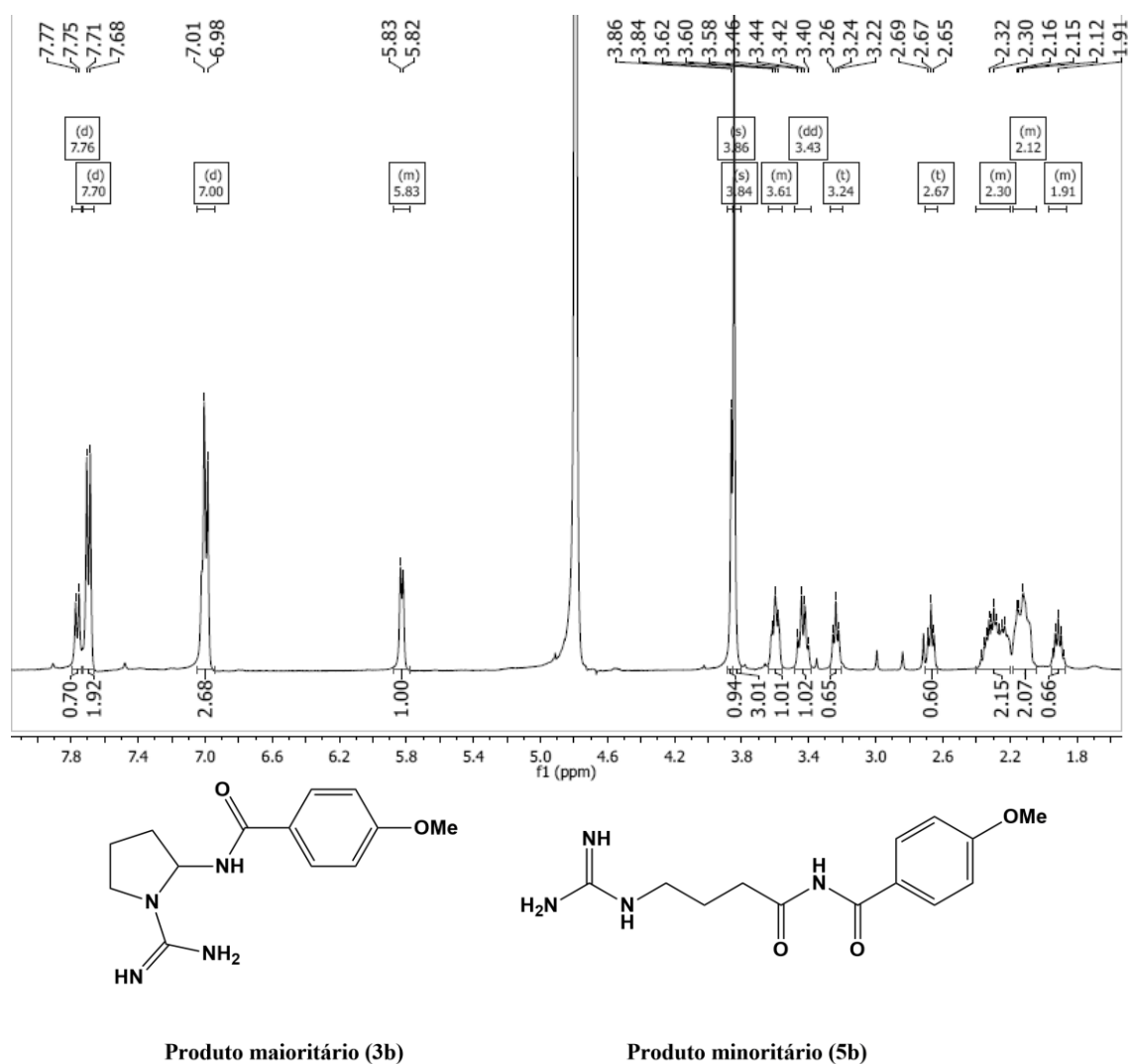


Figura 2.22 Em cima, espectro ¹H RMN, em D₂O, da mistura entre o produto (3b) e da imida (5b). Em baixo, estruturas destes dois compostos, respetivamente.

O baixo rendimento obtido é resultado da formação de produtos laterais (Tabela 2.6, entrada 1 e Tabela 2.7, entrada 1). Além da imida (5), forma-se também a benzamida (7a) no caso de o substrato ser (2a) e *p*-metoxibenzamida (7b) no caso de ser (2b). A formação das benzamidas respetivas é o resultado da hidrólise do ião imínio. Desta reação resulta também um aldeído, neste caso o 4-guanidinobutiraldeído (6). Esta reação lateral foi apontada para derivados *N*-acilados de aminoácidos por Cowden⁶⁰ e Huang *et al.*⁵⁹ Ambas as reações, oxidação a imida e clivagem oxidativa a amida e aldeído, estão demonstradas na Figura 1.20.

No sentido de encontrar condições que promovessem a formação do produto (3) sem promoverem a formação da imida ou a clivagem oxidativa, foram realizados vários ensaios com o substrato (2a) que se apresentam na Tabela 2.6. Todos produziram resultados insatisfatórios. Quer isto dizer que, ou a reação não ocorria, ou no espectro de ¹H RMN verificava-se a presença de imida.

Na reação realizada em AcOH como solvente (Tabela 2.6, entrada 4) verificou-se pelo espectro de ^1H RMN que a imida (**5a**) não se formou existindo apenas o produto (**3a**) e o reagente (**2a**), o que era um resultado promissor. Contudo, esta reação levou uma semana a ficar completa e o resultado final foi uma mistura muito complexa de produtos. A mistura de AcOH/H₂O 1:1 como solvente (Tabela 2.6, entrada 9) também não foi eficaz. Além do produto (**3a**), produziu também outro produto desconhecido.

De seguida decidiu-se introduzir CuSO₄.5H₂O na reação (Tabela 2.6, entrada 7), reproduzindo o procedimento de Huang *et al.*⁵⁹ Anderson e Kochi⁵⁵ tinham referido que o Cu²⁺ possuía um efeito sinérgico na reação e atuava como cocatalisador da Ag²⁺, podendo oxidar o radical alquilo depois da libertação de CO₂. Contudo, este ensaio produziu uma mistura complexa de produtos. Já a introdução de CuSO₄.5H₂O mas em quantidade estequiométrica (Tabela 2.6, entrada 12) permitiu obter o primeiro resultado promissor, representando uma melhoria significativa na proporção produto (**3**)/imida, 1:0,08. Nas mesmas condições da reação anterior mas agora a 60°C (Tabela 2.6, entrada 13) não se obteve uma alteração significativa na proporção produto (**3a**)/imida. Contudo, verificou-se uma aceleração da reação. Antes esta demorava 3h, em média, para ficar completa, mas com aquecimento passou a demorar apenas 30 minutos. A remoção de cobre deste ensaio (Tabela 2.6, entrada 14) também não produziu mudanças significativas na proporção, ficando esta em 1:0,1 de (**3a**)/imida. A reação ficou *overnight* para verificar se ocorreria hidrólise do produto ao longo do tempo, o que não se verificou neste período. Alterando a ordem de adição dos reagentes (Tabela 2.6, entrada 15), dissolveu-se o CuSO₄.5H₂O e o reagente (**2a**) em água e agitou-se a 60°C durante 15 minutos e só depois se procedeu à adição do AgNO₃ e do (NH₄)₂S₂O₈. Isto definiu o procedimento que seria usado para fazer as reações de descarboxilação oxidativa com os restantes derivados (**2**) visto que se obteve uma proporção de 1:0,05 produto (**3a**)/imida num rendimento de 72%. Este ensaio corrobora o papel sinérgico do cobre na reação e mostra que a ordem de adição dos reagentes é relevante, uma vez que a adição prévia de cobre ao substrato marcou a diferença no sucesso da reação. Aplicaram-se estas condições reacionais aos substratos (**2b**) e (**2c**) (Tabela 2.7, entrada 2 e Tabela 2.8, entrada 2). Em ambos os casos para os substratos (**2a**) e (**2b**) a presença de cobre demonstrou que se obtinham excelentes resultados, obtendo-se 72% e 80% de rendimento, respetivamente. A presença de imida foi ainda observada. Mais uma vez, a presença de Cu(II) demonstra um efeito sinérgico.

Todos os ensaios realizados com o substrato (**2c**) (Tabela 2.8) foram infrutíferos na tentativa de obter o produto (**3c**). Todos os espectros obtidos dos crudes reacionais mostraram uma mistura muito complexa em que era impossível sequer definir um produto maioritário.

A comparação visual de todas as reações mostrou diferenças entra as reações com o substrato (**2a**) e (**2b**) e a reação com o substrato (**2c**). Aquando a adição de CuSO₄.5H₂O, todas adquiriram

uma tonalidade azul clara como era de esperar, devido à presença do cobre. No decorrer e no fim das reações é que surgiram as diferenças. As duas primeiras apresentavam sempre um aspeto límpido. Gradualmente, verificava-se a alteração da cor de azul claro para verde claro. Por outro lado, as reações de **(2c)** adquiriam uma cor castanha rapidamente, após poucos minutos de reação. No fim, verificava-se a existência de um precipitado castanho com aspeto viscoso. As *TLC* das reações suportavam estas observações. As duas primeiras sugeriam uma reação eficaz, com poucos produtos laterais. A segunda mostrava uma mistura muito complexa de produtos pela quantidade de manchas apresentada. Outra indicação de que algo diferente acontecia nas reações de **(2c)** foi o tempo de reação. Ao contrário do que se tinha verificado com os substratos **(2a)** e **(2b)**, nas mesmas condições (Tabela 2.8, entrada 2) foram necessárias 5 h para o desaparecimento do material de partida, **(2c)**. Surpreendentemente, a ausência de Cu(II) (Tabela 2.8, entrada 3) permitiu que a reação fosse mais rápida, mas não mais eficaz.

Quando se tentou fazer a reação de descarboxilação oxidativa com *N*^α-hidrocinamoíl-L-arginina (**2e**) e com *N*^α-fenilacetil-L-arginina (**2f**), os resultados obtidos foram semelhantes aos de **(2c)** na medida em que se obtiveram misturas muito complexas de produtos e reações muito lentas.

No caso do substrato **2e** foram feitos 2 ensaios (Tabela 2.9). No primeiro caso (entrada 1), foram feitas duas purificações por *TLC* preparativa em placa de alumina, depois da coluna RP-18, uma vez que se conseguiu identificar o sinal do protão α, ainda que em pouca quantidade no crude. No entanto, ainda assim, obteve-se uma mistura algo complexa de produtos (Figura 2.23).

Tabela 2.9 Síntese dos ensaios para a obtenção de **(3e)**. Os métodos foram feitos de acordo com o procedimento geral em 2.2.1. T.a. é temperatura ambiente. Em nenhum dos métodos se conseguiu obter o produto **(3e)**. **a** Não se conseguiu obter o produto.

Entrada	Eq de AgNO ₃ /(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Eq de CuSO ₄	Solvente	T (°C)	t _{reação} (h)	η (%)
1	0,15:1,5	1	H ₂ O	60	6	a
2	0,15:1,5	1	H ₂ O	T.a.	48	a

Observando o espectro, é possível identificar o sinal do próton α a δ 5,93 ppm e os sinais a δ 3,65 e 3,49 ppm que identificam a ciclização do resíduo de arginina. Contudo, não é possível garantir que os tripletos a δ 3,16 e 2,60 ppm correspondam ao resíduo hidrocinaomóil de (**3e**) devido às integrações. Pode-se afirmar que estão pelo menos 3 produtos diferentes nesta mistura, com base nos sinais na zona entre δ 4 e 6 ppm.

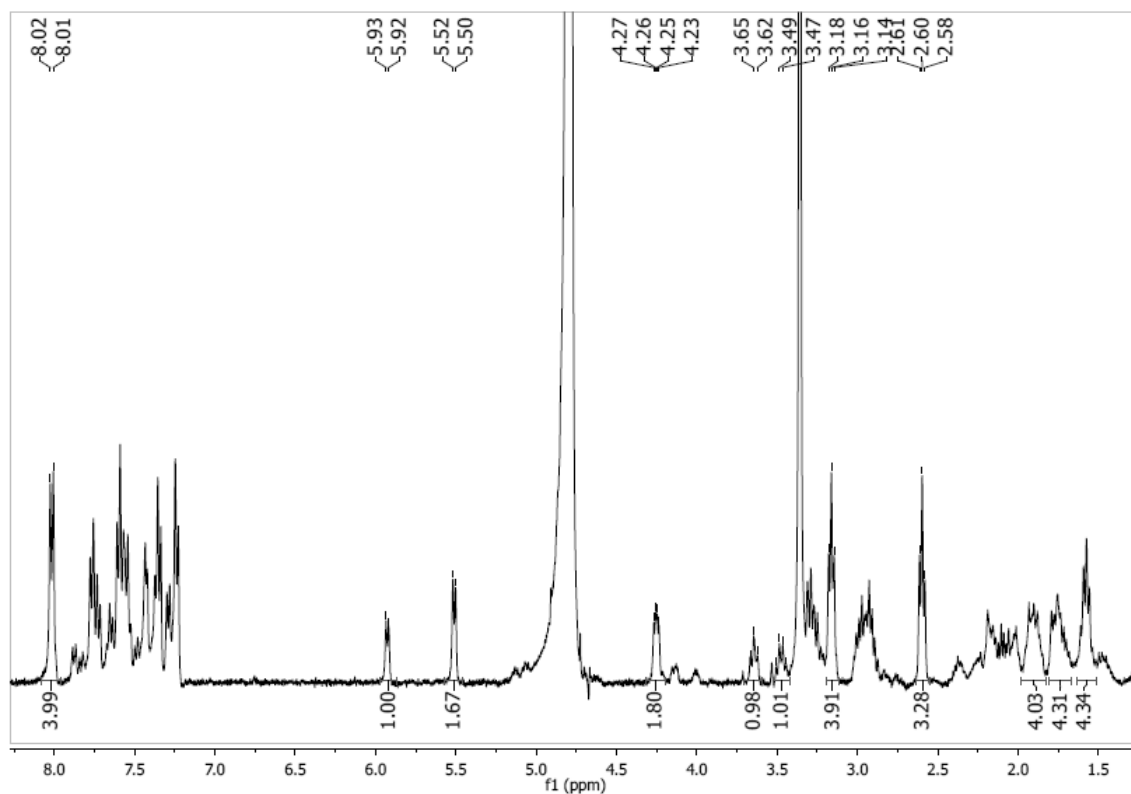


Figura 2.23 Espectro ^1H RMN, em D_2O , de uma fração recolhida da *TLC* preparativa onde se pensa estar o produto (**3e**).

No caso de (**2f**), nem sequer se conseguiu identificar o sinal que se esperaria para o próton α .

Por fim, a reação de descarboxilação de (*S*)-Boc-histidinil-*L*-arginina (**2i**), originou o que aparentam ser dois produtos, numa proporção de 3,8:1. Um é o produto ciclizado (**3i**), minoritário, identificado pelos sinais característicos já aqui mencionados. O outro parece ser reagente de partida. O espectro de ^1H RMN está na Figura 2.24. Repare-se que existe uma discrepância na integração dos prótons α , correspondentes ao resíduo de histidina e ao de arginina não ciclizada, de cerca de 1, o que remete para o sinal do próton α do resíduo de arginina ciclizado a δ 5,71 ppm.

Os sinais dos prótons do grupo imidazole, tanto do produto (**3i**) como do reagente (**2i**), encontram-se sobrepostos.

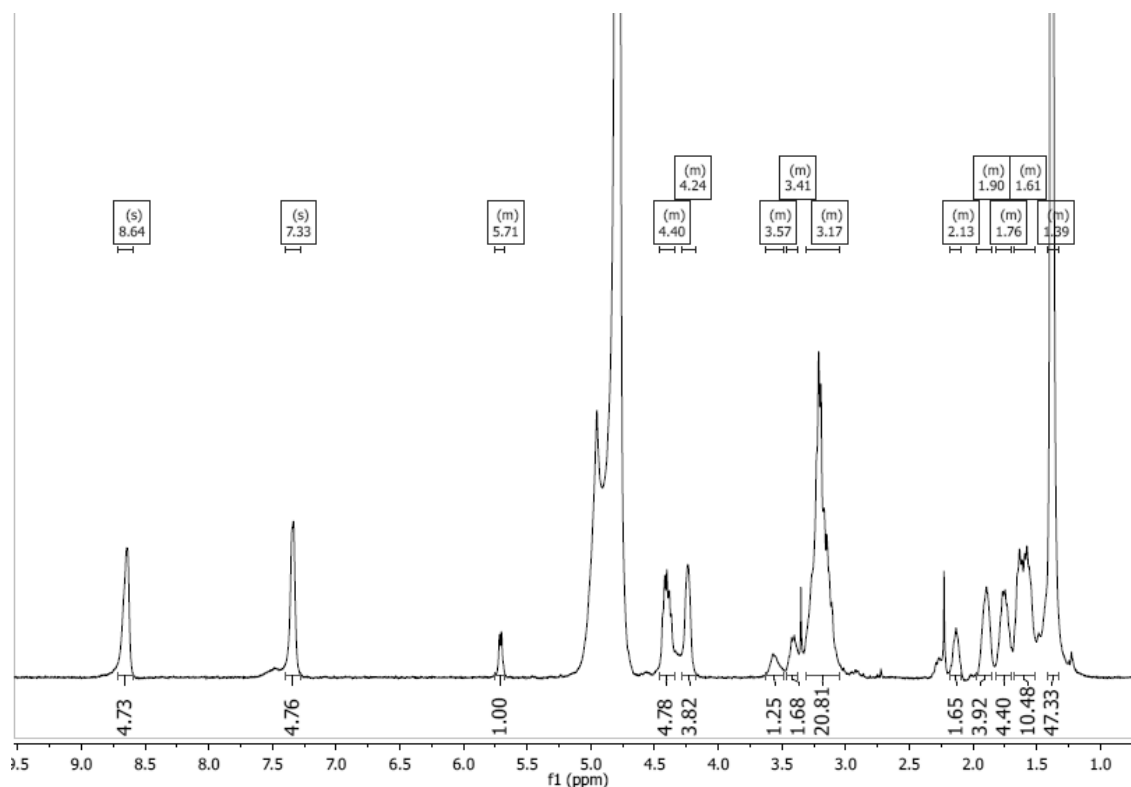


Figura 2.24 Espetro de ^1H RMN, em D_2O , da mistura obtida entre o reagente de partida (**2i**) e o produto ciclizado (**3i**).

Nos próximos parágrafos, discutir-se-á os resultados obtidos para as reações que tinham como reagentes os derivados (**2c**), (**2e**) e (**2f**).

Estruturalmente, a molécula (**2c**), N^α -cinamoíl-L-arginina, difere dos derivados (**2a**) e (**2b**) na medida em que contém uma dupla ligação *trans* entre o carbonilo da amida e o anel aromático (estruturas na Tabela 2.1). Como já foi referido anteriormente e como é mostrado nas Figuras 1.19 e 1.20, a reação de descarboxilação oxidativa quando feita com um sal de Ag^+ que é oxidado pelo peroxidissulfato a Ag^{2+} procede por um mecanismo que gera um radical alquilo na posição α . Sabe-se que os radicais são espécies reativas e que reagem particularmente com posições alílicas e benzílicas, onde são mais estáveis.³² A observação dos espectros dos ensaios com (**2c**) (Tabela 2.8) permitiu identificar o desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons da dupla ligação. Perante esta observação propõem-se duas hipóteses que a podem justificar.

A primeira hipótese que se coloca aqui é a ocorrência de uma ou várias reações laterais com o radical alquilo formado (Figura 2.25). Estas podem ser transferência do radical por reação com a dupla ligação do resíduo cinamoílo de (**2c**), nos dois primeiros casos, ou transferência de hidrogénio para a posição benzílica no caso de o derivado ser o hidrocinaomólo (**2e**) ou fenilacetilo (**2f**), nos dois últimos exemplos. É de notar que os estados de transição nos dois últimos casos são formados por anéis de seis e cinco membros, respetivamente, que normalmente favorecem as reações. Hua *et al*⁸³ publicaram uma reação de fluoração na posição benzílica que passa pela transferência de um radical α -aminoalquilo para um benzilo por transferência de hidrogénio, formando um radical benzilo. Este tipo de reação pode ter sido responsável pelos vários produtos formados na reação e a mistura complexa observada.

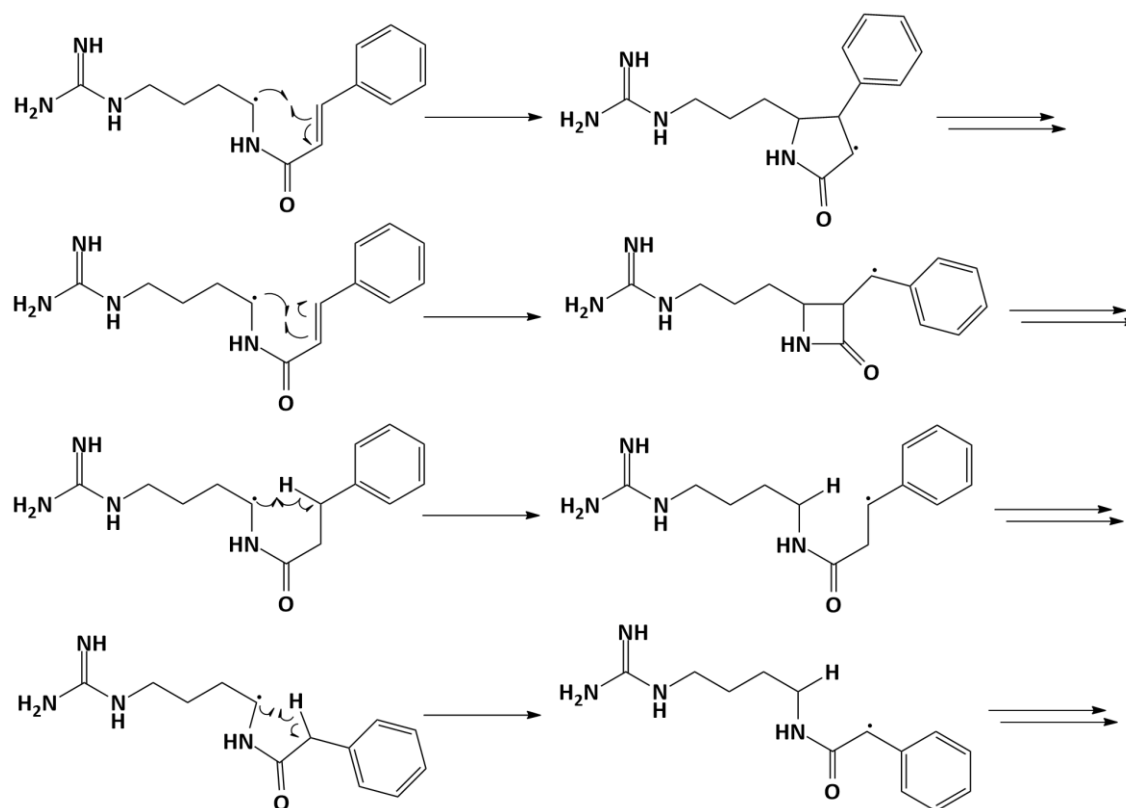


Figura 2.25 Reações laterais possíveis de ocorrer com o radical alquilo formado, após libertação de CO₂.

MacMillan *et al.*⁸⁴ e Cowden⁶⁰ reportam reações de *cross-coupling* e acoplamento de Minisci, respetivamente. Ambas as reações envolvem a geração de um radical α -aminoalquilo. A primeira descreve um *cross-coupling* entre este radical e um radical aromático, num areno mono ou pluri substituído. A segunda descreve o acoplamento de Minisci entre um radical α -amilaminoalquilo e heteroarenos eletrodeficientes.

Anderson e Kochi⁵⁵ referem que este radical é facilmente oxidado devido à elevada quantidade de oxidantes (Cu²⁺, Ag²⁺ e SO₄²⁻) presentes em solução. O que leva à segunda hipótese proposta.

A segunda hipótese possível é o ataque ao íon acilímínio por outros nucleófilos inter- ou intramoleculares além da guanidina. Relembre-se que o íon acilímínio é uma espécie altamente eletrofílica. Por exemplo, ataque por parte da dupla ligação do resíduo cinamoílo ao íon acilímínio, a primeira reação da Figura 2.26, ou ataque do enolato da amida, no caso do hidrocinaomóilo ou do fenilacetilo, duas últimas reações da Figura 2.26.

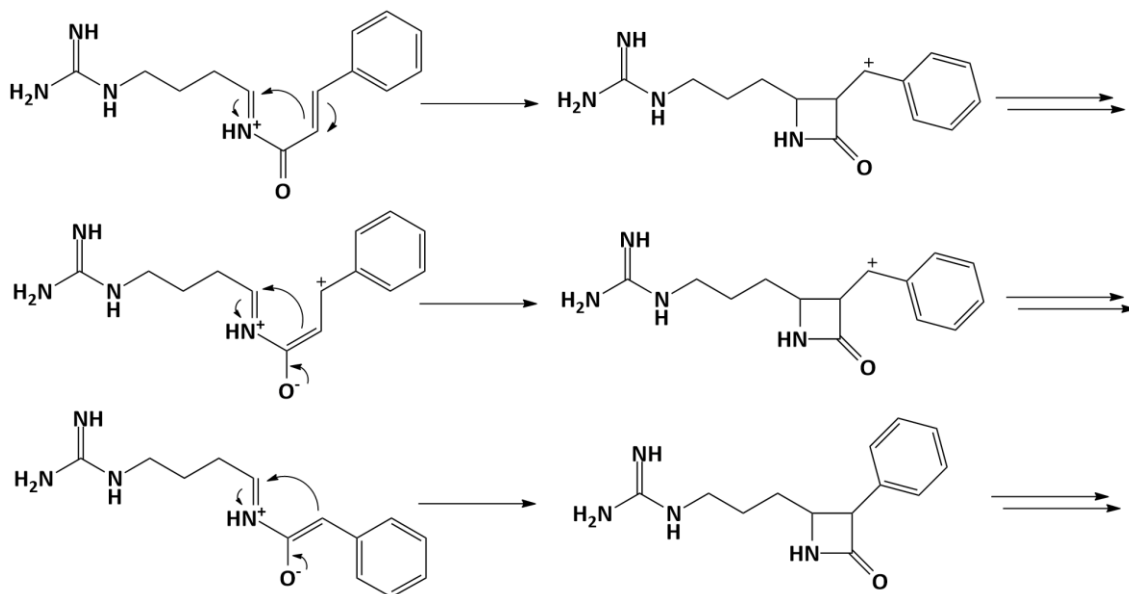


Figura 2.26 Reações laterais possíveis de ocorrer com o íon acilímínio no caso dos derivados (2c), (2e) e (2f).

Para se averiguar da veracidade destas hipóteses seria necessário, em primeiro lugar, proceder à separação e identificação dos compostos das misturas complexas formadas. Não se fez esta separação devido a limitações de tempo.

Num parágrafo anterior questionou-se o papel do cobre na reação. Huang *et al.*⁵⁹ apenas conseguiram obter imidas, semelhantes à (5) da Figura 2.21, quando usaram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em quantidade catalítica. Quando não usaram, obtiveram maioritariamente a amida do grupo de derivatização e o respetivo aldeído, tal como foi demonstrado por Cowden⁶⁰ (representados pelos números (7) e (6), respetivamente, no contexto deste trabalho na Figura 2.21).

No nosso caso, conseguiu-se obter a imida (5) sem o uso do cobre (Figura 2.21 e condições reacionais referidas no ensaio da Tabela 2.6, entrada 1 e tabela 2.7, entrada 1). Também se formou a amida do grupo acilo (7) e o aldeído (6) correspondente, mas em menor quantidade. Quando se usou cobre (Tabela 2.6, entrada 15 e Tabela 2.7, entrada 2) obteve-se os produtos de ciclização (3a) e (3b). A presença de cobre, no nosso caso, parece favorecer a reação de ciclização, desfavorecendo a clivagem oxidativa a aldeído e a segunda oxidação a imida. Existe a hipótese de ocorrer a formação de complexos das moléculas (2) tais que aproximem o azoto do grupo guanidina do íon acilímínio (Figura 2.27), favorecendo o ataque nucleofílico da primeira ao segundo. Há artigos que referem que o cobre(II) pode formar complexos com aminoácidos como glicina,⁸⁵ grupos amida⁸⁶ e grupos imina.⁸⁷

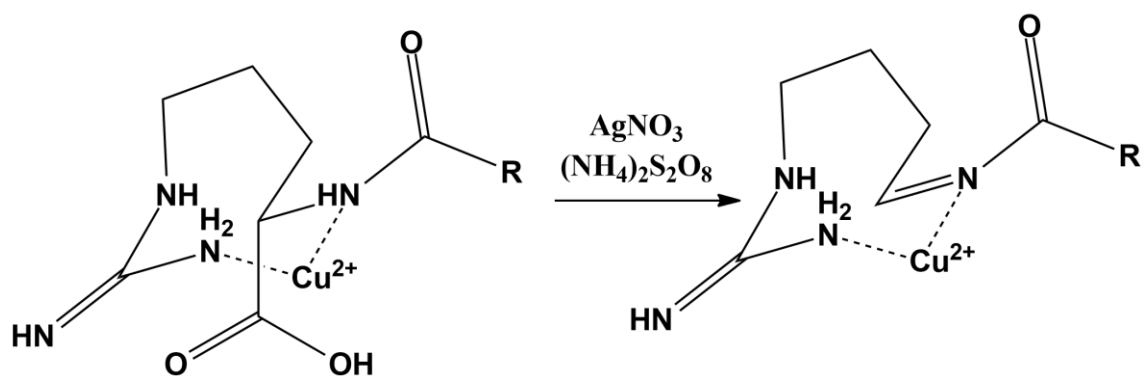


Figura 2.27 Possíveis complexos com cobre (II) do derivado (2), à esquerda, e do ião acilmímico, à direita, promovendo a aproximação entre o nucleófilo e o eletrófilo.

Independentemente das razões que levaram ao insucesso das reações de descarboxilação oxidativa com a maior parte dos substratos, o que os resultados experimentais permitem concluir é que este método que assenta na descarboxilação oxidativa com $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{CuSO}_4$ é muito vantajoso do ponto de vista da eficácia, da velocidade e da sustentabilidade da reação e, ao mesmo tempo, muito limitado na gama de substratos. Os resultados mostram que a reação apenas é aplicável a derivados benzilados da L-arginina e, possivelmente, a dipéptidos, tendo em conta o resultado obtido com o dipéptido com Boc-L-histidina (**2i**).

II.6. Reações de descarboxilação oxidativa com $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, CuSO_4 e ligandos quirais

As condições descritas para as reações de descarboxilação oxidativa descritas até aqui conduzem sempre à perda da quiralidade dos derivados (**2**) por ocorrer a formação do radical e do ião acilimínio do carbono assimétrico do resíduo de arginina. Como resultado, os derivados ciclizados (**3**) são racematos. Quis-se então testar a reação de descarboxilação oxidativa na presença de ligandos quirais. Em 2.3.1 está descrito o procedimento geral e a seguir os vários ligandos usados. Utilizou-se sempre (**2a**) como material de partida. O cobre foi adicionado em primeiro lugar, juntamente com o ligando, ficando a agitar em solução sob aquecimento para favorecer a formação de um complexo quiral. Só depois é que se adicionaram os restantes reagentes. Contudo, não se confirmou se ocorreu de facto a formação de um complexo.

A reações tendo a (\pm)-dihidrocinchonina e a (+)-cinchonina não produziram resultados positivos. Após a adição destes ligandos à mistura reacional, de cor azul clara, adquiriu muito rapidamente uma cor castanha escura. Ainda assim, conseguiu-se obter 9% de rendimento na reação com a (+)-cinchonina.

Dada a labilidade das cinchoninas perante as condições usadas decidiu-se utilizar (\pm)-BINAP. Também se verificou uma alteração da cor na reação. Conseguiu-se obter um rendimento de 51%.

Por fim, utilizou-se (+)-BINOL. Todavia, com este ligando não se conseguiu obter o produto. Nesta reação também se verificou uma mudança na cor da mesma.

As medições de rotação ótica das amostras obtidas nas reações com (+)-cinchonina, (\pm)-BINAP e do produto do ensaio descrito na Tabela 2.6, entrada 15 mostraram que todas continham um racemato. Uma razão possível para o fracasso do uso dos ligando quirais e obter-se racematos foi a destruição nas condições reacionais do complexo formado com os ligandos antes de ocorrer a reação de descarboxilação oxidativa, suportada pelas mudanças rápidas nas cores das reações com os diferentes ligandos.

II.7. Separação dos enantiômeros do produto final

Tentou-se obter a separação dos dois enantiômeros de **(3a)** através da formação de sais diaestereoméricos com ácido L-tartárico e com o próprio reagente de partida **(2a)** (Figura 2.28). Também se utilizaram sais de itérbio e de európio para se tentar distinguir os dois enantiômeros no espectro de ^1H RMN. Todas estas tentativas foram infrutíferas dado que nunca se conseguiu obter um dos enantiômeros.

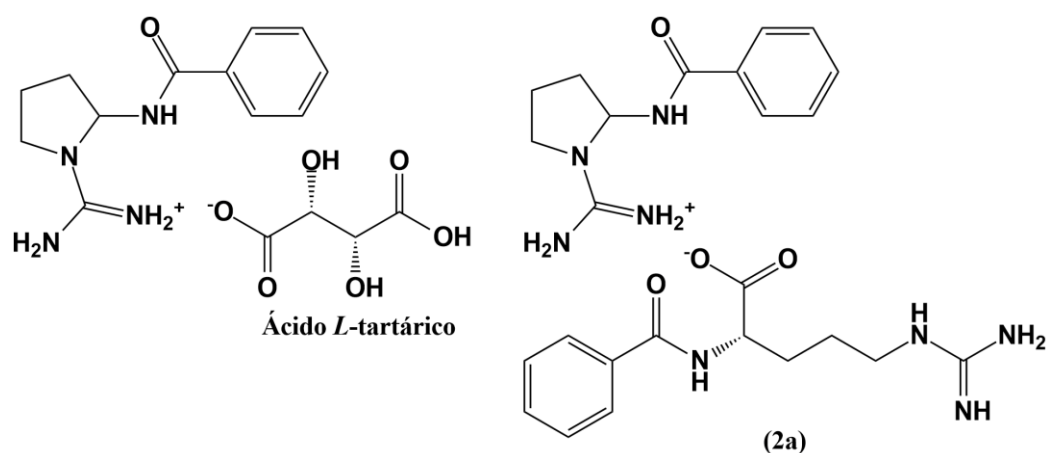


Figura 2.28 Sais do produto **(3a)** com ácido L-tartárico (à direita) e com o reagente derivado **(2a)** (à esquerda).

III. Conclusões e perspectivas futuras

III. Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho aqui apresentado teve em vista dois grandes objetivos: primeiro, a síntese do núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina e segundo a síntese do produto natural cernumidina e análogos. O presente trabalho apresenta um método para alcançar estes objetivos que parte do aminoácido L-arginina, no sentido de desenvolver uma via biomimética para sintetizar a cernumidina e análogos.

Este método contempla apenas dois passos de síntese, a derivatização em N^{α} da L-arginina e a descarboxilação oxidativa desses produtos derivados. Esta segunda reação é a chave para se obter o núcleo carboxamidina, pois através de um mecanismo radicalar, liberta CO_2 , forma um ião acilimínio e cicliza a cadeia lateral da arginina através de um ataque nucleofílico da guanidina ao ião acilimínio.

A derivatização de L-arginina foi conseguida através de um de dois caminhos possíveis, ambos com o mesmo pressuposto, a ativação do ácido carboxílico pelo reagente de derivatização. O primeiro caminho envolvia a formação o cloreto de ácido respectivo. O segundo recorria a reagentes de acoplamento, nomeadamente o CDI. De uma forma geral, o caminho da reação com o cloreto de ácido provou ser mais vantajoso, permitindo obter rendimentos até 81%, maior rapidez nas reações e em termos práticos ser mais fácil de trabalhar. Em casos específicos, quando os reagentes em causa não o permitiam, não se recorreu à formação do cloreto de ácido, dando preferência ao CDI. Isto aconteceu quando a molécula em causa (Boc-L-histidina) tinha um grupo protetor (Boc) intolerante a condições ácidas.

Inicialmente, a descarboxilação oxidativa dos derivados (**2**) foi feita com o par de reagentes DIB/ I_2 , sendo o DIB um reagente de iodo hipervalente (III). Este reagente por ser muito eletrofílico e sujeito a ataque por solventes nucleofílicos obrigava a que as reações fossem feitas em DCM. Isto provou ser prejudicial para o sucesso da reação, dado que os derivados (**2**) são bastante polares e solúveis apenas em água e metanol, pelo que estes encontravam-se precipitados no meio reacional, tornando muito difícil conseguir uma reação completa. Apenas dois derivados produziram resultados, ainda que modestos, com rendimentos de 7% e 15%. O melhor resultado com este método foi um rendimento de 59% tendo como solvente DCM/AcOH 1:3.

Uma nova estratégia foi adotada. Consistia na descarboxilação oxidativa da L-arginina, originando o produto ciclizado, que depois seria derivatizado com o cloreto de ácido. O oxidante usado foi NBS. No entanto, esta estratégia mostrou-se ineficaz, dado que apenas se conseguiu obter o nitrilo correspondente da L-arginina.

Decidiu-se explorar outra alternativa para a descarboxilação, o uso de sais de prata. Primeiro, tentou-se o picolinato de Ag(II), que se mostrou pouco eficiente. De seguida, optou-se pelo par $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, em que o nitrato de prata é usado em quantidades catalíticas. Embora ainda carecesse de otimização, mostrou-se logo à partida mais eficiente e sustentável que o método do DIB/I₂. Este método colocou um obstáculo difícil de ultrapassar, a formação de um produto lateral de dupla oxidação, uma imida, que coeluiu com o produto (**3**), tornando a purificação impossível. Vários ensaios levaram-nos à introdução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Este sal marcou a diferença na eficiência da reação, em conjunto com o aquecimento conseguindo-se rendimentos da ordem dos 70-80%. Nos vários ensaios, percebeu-se que a quantidade de cobre usada tem de ser estequiométrica e a ordem de adição influencia o resultado final. Este método prima pela sua eficácia e sustentabilidade. A reação é feita em água, usa um catalisador (Ag^+) e um cocatalisador (Cu^{2+}) recuperáveis, dispõe de reagentes baratos e é extremamente rápida, podendo ficar completa em 30 minutos com um aquecimento a 60 °C, num processo suave. Os resultados apontam também para um outro papel do cobre na reação, como quelante, aproximando os centros reacionais.

Infelizmente, este método está muito limitado em termos de substratos. Apenas é viável para derivados benzoilados da L-arginina. O dipéptido (*S*)-Boc-histidinil-L-arginina também parece ter produzido resultados promissores. Todos os outros incorrem em reações laterais que originam misturas muito complexas de produtos. A síntese da cernumidina por este método é impossível.

As reações partindo deste método e usando ligandos quirais mostraram-se ineficazes, dado a labilidade destes ligandos perante as fortes condições oxidantes. Todos os produtos obtidos eram racematos. As tentativas de separar os enantiómeros da reação de descarboxilação oxidativa também se mostraram infrutíferas.

No futuro, deve encontrar-se uma nova abordagem que não apresente as limitações desta aqui apresentada. A descarboxilação oxidativa de L-arginina com o método de $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8/\text{CuSO}_4$ formaria o núcleo 2-aminopirrolidin-1-il carboxamidina. Este reagiria, por sua vez, com um cloreto de ácido dando do produto final (**3**) (Figura 3.1). Este

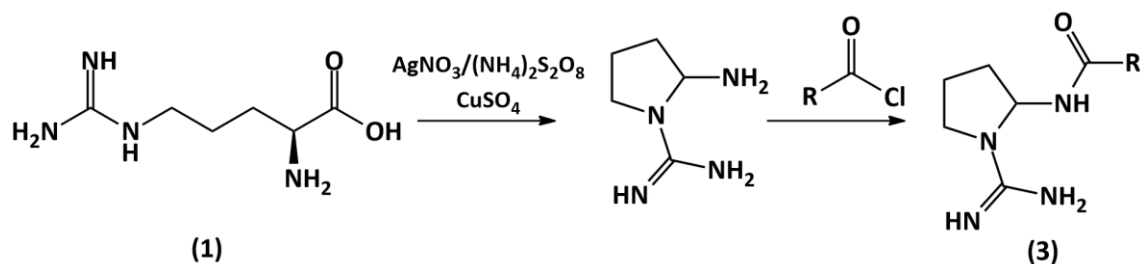


Figura 3.1 Síntese alternativa para a obtenção dos produtos (**3**).

caminho sintético não apresentaria limitação do substrato. Quanto à perda de quiralidade, uma resolução enantiomérica pode ser uma alternativa a experimentar.

IV. Parte experimental

IV.Procedimento experimental

IV.1. Preâmbulo

Os reagentes utilizados na parte experimental desta tese foram adquiridos à *Sigma-Aldrich*, *TCI Chemicals* e *Alfa-Aesar*. Os solventes utilizados nas reações e nos eluentes foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* e à *LaborSpirit*. Todos os solventes foram utilizados sem purificação adicional, exceto quando mencionado que foram utilizados secos.

As reações foram acompanhadas por *TLC* em placas de sílica *Merck Kieselgel GF 254* com 0,2 mm de espessura em suporte de alumínio. A revelação das *TLC* fez-se com recurso a uma lâmpada de UV (254 nm) e, posteriormente, com reagente de ninidrina ou reagente de Dragendorff.

A purificação das reações fez-se em cromatografia em coluna de fase reversa com sílica *Merck LiChroprep RP-18*, de granulometria 40-63 μm , e *TLC* preparativa com sílica *Merck Kieselgel GF 254* com 0,2 mm de espessura em suporte de alumínio ou 0,5 mm de espessura em suporte de vidro. A revelação das *TLC* fez-se com recurso a uma lâmpada de UV (254 nm) e, posteriormente, com reagente de ninidrina ou reagente de Dragendorff.

A caracterização dos compostos fez-se através dos espectros de absorção de UV, de espectroscopia de RMN de protão e carbono, espectroscopia de IV, medição dos pontos de fusão e espectrometria de massa (*ESI-MS*).

A aquisição dos espectros de absorção de UV fez-se num espectrofotómetro *Thermo Corporation Helius γ* , na gama dos 190 a 350 nm, com células de quartzo com 1 cm de percurso ótico.

A aquisição dos espectros de RMN de protão (^1H RMN) e de carbono (^{13}C RMN) fez-se num espectrómetro *Brucker ARX400*, traçando os espectros a 400MHz e 101 MHz para protão e carbono, respetivamente. As constantes de acoplamento, *J*, são dadas em Hz. O espectrómetro foi calibrado tetrametilsilano (TMS). A apresentação dos dados obedece ao seguinte formato: solvente deuterado, desvio químico (multiplicidade do sinal, constantes de acoplamento, integração relativa, atribuição do sinal). Os desvios químicos são apresentados tendo o desvio do solvente como referência.

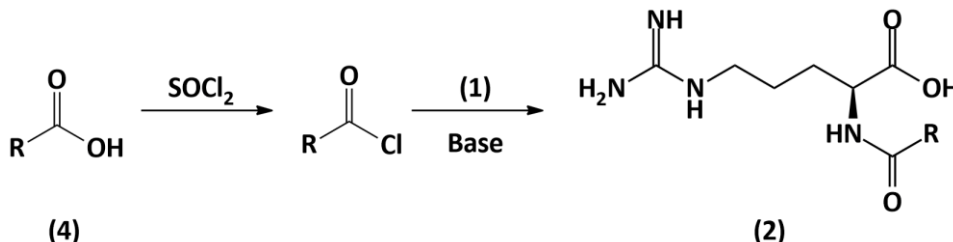
Os espectros de IV foram adquiridos num espectrofotómetro *Perkin Elmer Spectrum Two*, com o módulo de reflexão total atenuada (*ATR*). A aquisição dos espectros foi feita na gama de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Na descrição dos espectros são apenas indicados máximos de absorção das frequências mais relevantes, obedecendo ao seguinte formato: frequência do máximo de absorção (atribuição do grupo funcional, se possível).

A espectrometria de Massa (ESI-MS) foi efetuada num espectrómetro de massa híbrido *LTQ Orbitrap XL* da *Thermo Fischer Scientific, Bremen Germany* controlado pelo *software LTQ Tune Plus 2.5.5* e *Xcalibur 2.1.0*. Em modo positivo, a voltagem do capilar da fonte de ionização por eletrospray foi de 3,1 kV. Temperatura do capilar foi 275 °C. O gás de nebulização estava a 5 (unidade arbitrária das definições do *software*). A voltagem do capilar foi de 36 V e a da lente do tubo foi de 85 V. Em modo negativo, a voltagem do capilar da fonte de ionização por eletrospray foi de 3,0 kV. Temperatura do capilar foi 275 °C. O gás de nebulização estava a 5 (unidade arbitrária das definições do *software*). A voltagem do capilar foi de -50 V e a da lente do tubo foi de -150 V.

IV.2. Síntese de N^α derivados de L-arginina

IV.2.1. Através de reação com cloretos de ácido

IV.2.1.1. Procedimento geral



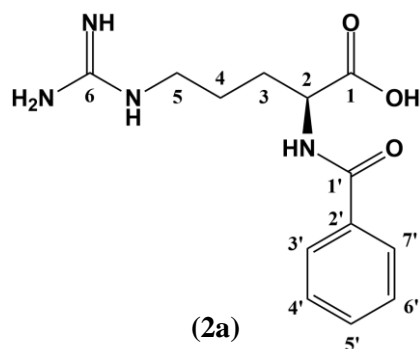
Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se 1,2 eq de ácido carboxílico (2) em tolueno seco numa concentração final de 0,5 M e adicionou-se 10 eq de $SOCl_2$. Alternativamente a reação pode também ser feita sem solvente (ou *neat*). A reação decorreu a refluxo, durante aproximadamente 1 h. Evaporou-se os componentes voláteis. Verificou-se o consumo do ácido através de *ATR-FTIR*, observando o desaparecimento da banda característica do ácido ($\approx 1700\text{ cm}^{-1}$) e o aparecimento da banda do cloreto de ácido ($\approx 1790\text{ cm}^{-1}$).

O cloreto de ácido foi adicionado lentamente a 1 eq de L-arginina (1) numa solução aquosa, arrefecida a 0°C e basificada com 2 eq de Na_2CO_3 ($pH \approx 10$, verificado com papel indicador universal). A reação decorreu durante 5 min a frio e depois deixou-se reagir à temperatura ambiente e em atmosfera inerte. A reação foi acompanhada por *TLC*, eluindo com misturas de DCM/MeOH (9:1) e de DCM/MeOH/ H_2O (13:7:1) e/ou (65:20:2) e procedendo à revelação com reagente de ninidrina até consumo total da arginina. As reações decorreram entre 24 h a 72 h.

Acidificou-se a mistura reacional com HCl 3 M até pH 1 e depois extraiu-se com DCM. Basificou-se até pH 8 com NaOH 4 M. A fase aquosa foi separada por cromatografia em coluna de fase reversa RP-18, eluindo com misturas de água/metanol por ordem decrescente de polaridade de 10 em 10%, começando de 0% até 50% de metanol (50 mL de cada mistura). As frações recolhidas foram analisados por UV-Vis e as que apresentavam espectro semelhante foram juntas, evaporados à secura e analisados por 1H RMN.

IV.2.1.2. Síntese de *N*^α-benzoíl-L-arginina (**2a**)

De acordo com o procedimento da literatura,⁸⁸ a uma solução de L-arginina (**1**) (4g, 22,96 mmol, 1 eq) em 20 mL de H₂O destilada adicionou-se lentamente, durante 15 min, 3 mL de cloreto de benzoílo (**2a**) comercial (1,1 eq, 25,26 mmol, 3,56 g) e, de seguida, 3,90 g de Na₂CO₃ (1,6 eq, 36,74 mmol). A reação ocorreu sob agitação e à temperatura ambiente durante 24 h. Acompanhou-se por *TLC*, eluição com CHCl₃, 10% de metanol e revelação com UV (254 nm) e reagente de ninidrina, com a qual a mancha do produto adquire cor amarela.



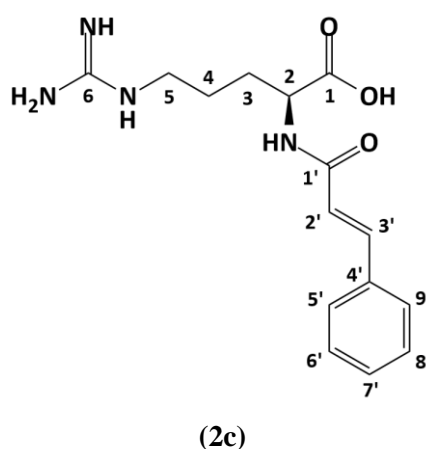
Acidificou-se a mistura reacional com HCl 3 M até pH 1. Filtrou-se o precipitado. O filtrado foi extraído com éter etílico. A fase aquosa foi basificada até pH 8 com NaOH 4 M. Esta última foi filtrada a vácuo, obtendo-se o produto na forma de um sólido branco que foi seco sob vácuo. Obtiveram-se 3,02 g (10,85 mmol) de *N*^α-benzoíl-L-arginina (**2a**) com rendimento de 47%.

P.f. 285-288 °C. **IV (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹)** 3200 (NH), 3021 (C-H aromáticos, O-H), 1677 (C(=O)OH), 1615 (NC(=O)Ph), 1592 (C=C aromático). **¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ** 7,80 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, H-3' e H-7'), 7,62 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, H-5'), 7,54 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H, H-4' e H-6'), 4,41 (dd, *J* = 8,1, 5,1 Hz, 1H, H-2), 3,23 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H, H-5), 2,07 – 1,92 (m, 1H, H-3a), 1,91 – 1,77 (m, 1H, H-3b), 1,75-1,63 (m, 2H, H-4). **¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ** 178,22 (C-1), 169,94 (C-1'), 156,62 (C-6), 133,42 (C-2'), 132,06 (C-5'), 128,64 (C-3' e C-7'), 126,97 (C-4' e C-6'), 55,04 (C-2), 40,58 (C-5), 28,95 (C-3), 24,50 (C-5).

IV.2.1.3. Síntese de *N*^α-(*E*)-(3-fenil)acrilóil-L-arginina (**2c**)

De acordo com o procedimento geral descrito em 1.1.1 partiu-se de 2,04 g (13,8 mmol) de ácido cinâmico (**4c**) e adicionou-se 8,3 mL de SOCl₂ (13,8 mmol). Obteve-se um óleo laranja que reagiu com 2 g (11,5 mmol) de L-arginina (**1**) e 731 mg (6,9 mmol, 0,6 eq) de Na₂CO₃, dissolvidos em 10 mL de H₂O.

Filtrou-se o precipitado, que continha o ácido cinâmico não reagido, produto e L-arginina. O filtrado foi evaporado à secura e lavado com DCM frio para remover o ácido cinâmico que não reagiu. O precipitado foi redissolvido em 100 mL água, acidificou-se até pH 1 com HCl 3 M e extraiu-se com 50 mL de DCM para remover o ácido cinâmico que não reagiu. A fase aquosa foi basificada até pH 8 com NaOH 4 M. Juntaram-



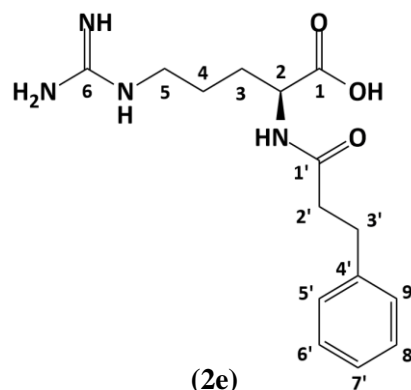
se o precipitado lavado com DCM frio e a fase aquosa basificada até pH 8. Recristalizou-se o produto da água. Decantou-se a água e lavou-se o precipitado com água gelada. Obtiveram-se 1,53g de *N^α*-(*E*)-(3-fenil)acrilóil)-L-arginina (**2c**) num rendimento total de 44%.

P.f. 190-192 °C. **IV (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})** 3333 (N-H), 3161 (N-H amida *bonded*), 3046 (O-H *bonded*), 2944 (C-H), 1667 (C(=O)OH), 1567 (amida II). **^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ** 7,54 – 7,44 (m, 3H, H-3', H-5' e H-9'), 7,43 – 7,31 (m, 3H, H-6', H-7' e H-8'), 6,73 (d, J = 15,8 Hz, 1H, H-2'), 4,46 (dd, J = 7,6, 4,8 Hz, 1H, H-2), 3,23 (tt, J = 13,5, 6,8 Hz, 2H, H-5), 2,04 – 1,91 (m, 1H, H-3a), 1,89 – 1,76 (m, 1H, H-3b), 1,75 – 1,62 (m, 2H, H-4). **^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ** 177,61 (C-1), 166,61 (C-1'), 157,30 (C-6), 140,14 (C-3'), 134,93 (C-4'), 129,28 (C-7'), 128,45 (C-6' e C-8'), 127,48 (C-5' e C-9'), 120,83 (C-2'), 54,29 (C-2), 40,67 (C-5), 29,80 (C-3), 24,86 (C-4). **ESI-HRMS:** calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$ 305,16139, encontrado 305,16155

IV.2.1.4. Síntese de *N^α*-(3-fenilpropanil)-L-arginina (**2e**)

De acordo com o procedimento geral em 1.1.1, fez-se reagir 517 mg (3,44 mmol) de ácido 3-fenilpropanóico (ácido hidrocinâmico) (**4e**), em 7 mL de tolueno seco, com 2,5 mL (34,4 mmol) de SOCl_2 . Obteve-se um óleo amarelado que se fez reagir com 500 mg (2,87 mmol) de L-arginina (**1**) em 10 mL de H_2O , 2 eq em Na_2CO_3 .

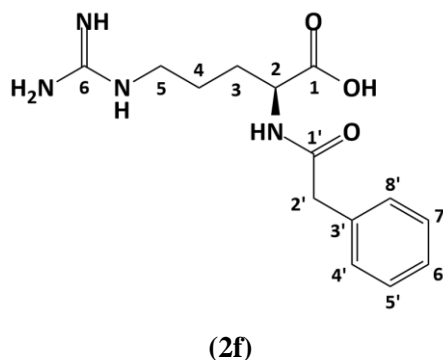
Parou-se a reação após 48 h. Acidificou-se com HCl 3 M até pH 1 e extraiu-se com 3 X 5 mL de DCM. As fases orgânicas foram juntas e lavadas com 10 mL de HCl 0,1 M. Todas as fases aquosas foram juntas e neutralizadas até pH 8 com NaOH 4 M e evaporadas à securo. O crude foi separado por cromatografia em coluna de fase reversa RP-18, como descrito em 1.1.1. Obteve-se 552 mg de um sólido branco com rendimento de 63%.



P.f. 125-128 °C. **IV (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})** 3258 (N-H), 3160 (N-H amida *bonded*), 2969 (C-H), 2872 (C-H), 1633 (NC(=O) amida I), 1557 (amida II), 1394. **^1H RMN (400 MHz, D_2O) δ** 7,35 (t, J = 7,4 Hz, 2H, H-6' e H-8'), 7,31 – 7,22 (m, 3H, H-5', H-6' e H-9'), 4,05 (dd, J = 8,3, 4,2 Hz, 1H, H-2), 3,04 – 2,85 (m, 4H, H-5 e H-3'), 2,63 (t, J = 6,9 Hz, 2H, H-2'), 1,72 – 1,59 (m, 1H, H-3a), 1,56 – 1,43 (m, 1H, H-3b), 1,15 (p, J = 7,5 Hz, 2H, H-4). **^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ** 178,55 (C-1), 174,90 (C-1'), 156,50 (C-6), 140,33 (C-4'), 128,58 (C-6' e C-8'), 128,49 (C-5' e C-9'), 126,35 (C-7'), 54,32 (C-2), 40,54 (C-5), 37,24 (C-2'), 31,26 (C-3'), 28,69 (C-3), 24,12 (C-4). **ESI-HRMS:** calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$ 307,17704, encontrado 307,17714

IV.2.1.5. Síntese de *N*^α-fenilacetil-L-arginina (**3f**)

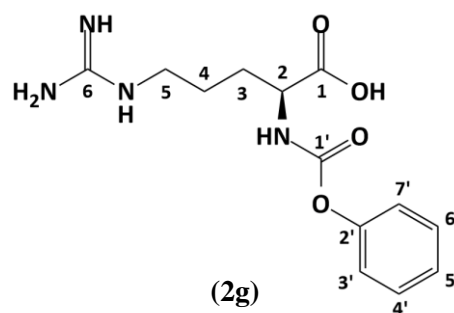
De acordo com o procedimento geral descrito em 1.1.1, reagiu-se 469 mg (3,44 mmol) de ácido fenilacético (**4f**) com 2,5 mL (34,4 mmol, 12 eq) de SOCl₂. Obteve-se um óleo amarelado que se fez reagir com 500 mg (2,87 mmol) de L-arginina em 10 mL de H₂O, 2 eq em Na₂CO₃. Após purificação, obteve-se 681 mg de um sólido branco num rendimento de 81%.



P.f. 138-141 °C. **IV (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹)** 3262 (N-H), 3172 (N-H amida *bonded*), 3056 (C(=O)O-H *bonded*), 2864 (C-H), 1634 (NC(=O) amida I), 1557 (amida II), 1495 (C=C aromático) 1394. **¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ** 7,50 – 7,29 (m, 5H, H-4', H-5', H-6', H-7' e H-8'), 4,19 (dd, *J* = 8,1, 4,8 Hz, 1H, H-2), 3,64 (d, *J* = 31,9 Hz, 2H, H-2'), 3,11 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, H-5), 1,89 – 1,77 (m, 1H, H-3a), 1,75 – 1,61 (m, 1H, H-3b), 1,59 – 1,43 (m, 2H, H-4). **¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ** 178,47 (C-1), 173,97 (C-1'), 156,54 (C-6), 135,15 (C-3'), 129,06 (C-5' e C-7'), 128,89 (C-4' e C-8'), 127,25 (C-6'), 54,57 (C-2), 42,43 (C-2'), 40,49 (C-5), 28,77 (C-3), 24,38 (C-4). **ESI-HRMS:** calculado para C₁₄H₂₁N₄O₃ [M]⁺ 293,16139, encontrado 293,16135.

IV.2.1.6. Síntese de *N*^α-fenoxycarbonil-L-arginina (**2g**)

De acordo com o procedimento de Moynihan e Yu,⁷¹ dissolveu-se 500 mg (2,9 mmol, 1 eq) de L-arginina (**1**) em 2 mL de água 1 M em NaHCO₃ e 4 N em NaOH. Adicionou-se 0,4 mL (3,2 mmol, 1,1 eq) de fenilcloroformato (**4g**), lentamente, durante, aproximadamente 15 min. Deixou-se reagir à temperatura ambiente e sob atmosfera inerte durante 1h.

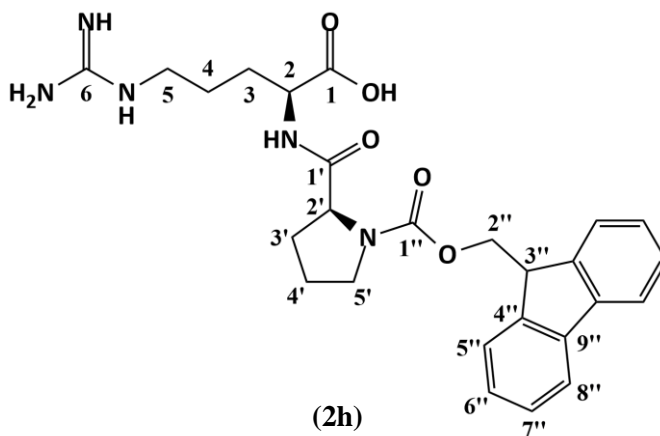


Após purificação, de acordo com o procedimento geral descrito em 1.1.1, obtiveram-se 336 mg de um sólido branco com rendimento de 38%.

P.f. 108-111 °C. **IV (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹)** 3029 (C(=O)O-H *bonded*), 1719 (NC(=O)OPh), 1632 (C(=O)OH), 1563, 1474, 1364, 1203. **¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ** 7,23 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H, H-4' e H-6'), 7,07 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H, H-5'), 6,99 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, H-3' e H-7'), 4,01 – 3,90 (m, 1H, H-2), 3,09 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H, H-5), 1,91 – 1,74 (m, 1H, H-3a), 1,74 – 1,54 (m, 3H, H-3b e H-4). **ESI-HRMS:** calculado para C₁₃H₁₉N₄O₄ [M]⁺ 295,14066, encontrado 295,13994.

IV.2.1.7. Síntese de (S)-1-(9-fluorenilmetoxycarbonil)prolil-L-arginina (**3h**)

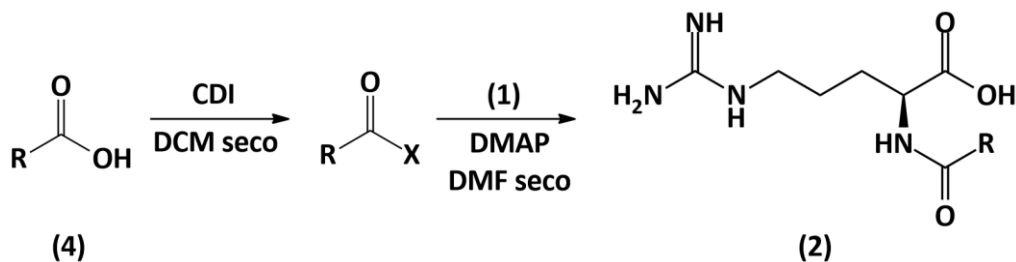
De acordo com o procedimento em 1.1.1, fez-se reagir 1,07 g (3,16 mmol) de Fmoc-L-prolina (**4h**) com 2,3 mL (31,6 mmol) de SOCl_2 . Após se evaporarem os componentes voláteis, adicionou-se 5 mL de THF seco para dissolver o cloreto de ácido, um sólido amarelo. Este reagiu com 500 mg (2,87 mmol, 1 eq) de *L*-arginina, em 20 mL de H_2O com 2 eq de AcONa . A reação ocorreu durante 42 h.



Tentou-se purificar segundo o procedimento geral, mas com pouca eficácia. Separou-se o crude numa coluna de sílica RP-18 nas condições descritas. Não foi possível identificar o produto nas frações recolhidas.

IV.2.2. Através de reagentes de acoplamento

IV.2.2.1. Procedimento geral



Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se 1,2 eq do ácido carboxílico (2) em DCM seco, com concentração de 0,5 M, aproximadamente. Adicionou-se 1,5 eq do reagente de acoplamento CDI. A reação decorreu em atmosfera inerte e à temperatura ambiente. Acompanhou-se por *TLC*, eluindo com DCM/MeOH (19:1) e revelação com UV (254 nm) e com reagente de Dragendorff.

Quando se verificou o consumo total do ácido, evaporou-se o DCM e adicionou-se DMF seco. Adicionou-se 1 eq de L-arginina (1), aproximadamente 0,5 M no DMF. Opcionalmente, pode adicionar-se 0,1 eq de DMAP catalítico. A reação decorreu em atmosfera inerte e a 80 °C. Acompanhou-se por *TLC*, eluindo com misturas de DCM/MeOH/H₂O (13:7:1 e 65:20:2) e revelação com UV (254 nm), reagentes de ninidrina e Dragendorff.

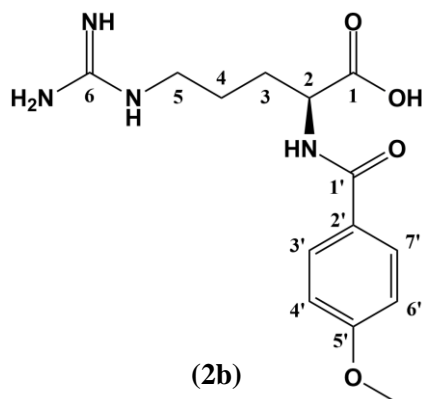
Parou-se a reação e destilou-se o DMF. O crude foi purificado por cromatografia em coluna de fase reversa RP-18, tendo como eluentes misturas de H₂O e MeOH, decrescendo em polaridade de 0% até 50% de Metanol, 50 mL de cada mistura. Os tubos recolhidos foram analisados por UV-Vis e aqueles que apresentavam espectros semelhantes foram juntos, evaporados à secura e analisados por RMNRMN.

IV.2.2.2. Síntese de *N*^α-*p*-metoxibenzoíl-L-arginina (2b)

Nesta reação, o reagente limitante foi o ácido *p*-metoxibenzoico (4b). De acordo com o procedimento geral em 1.2.1, dissolveu-se 1 g (6,57 mmol, 1 eq) de ácido *p*-metoxibenzoico (4b) em 15 mL de DCM seco e fez-se reagir com 1,27 g (7,88 mmol, 1,2 eq) de CDI, durante 4h.

Adicionou-se 1,37 g de L-arginina (1) (7,88 mmol, 1,2 eq) suspensa em 10 mL de DMF seco.

Parou-se a reação após 5 dias. Obteve-se 1,19 g (3,86 mmol) de um sólido branco com rendimento de 59%.

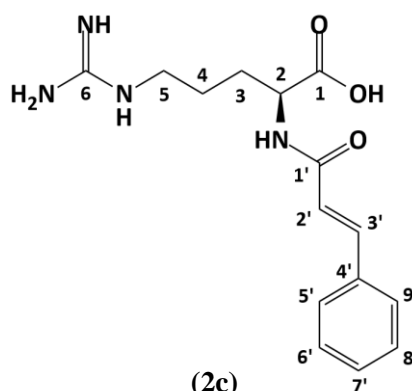


P.f. 90-93 °C. **IV (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})** 3160 (OH), 1604 (NC(=O)Ar), 1543 (amida II), 1501 (C=C aromático), 1393, 1252 (=C-OCH₃). **^1H RMN (400 MHz, D₂O) δ** 7,79 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-3' e H-7'), 7,05 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-4' e H-6'), 4,39 (dd, J = 7,8, 5,2 Hz, 1H, H-2), 3,88 (s, 3H, OMe), 3,22 (t, J = 6,7 Hz, 2H, H-5), 2,05-1,91 (m, 1H, H-3a), 1,89 – 1,76 (m, 1H, H-3b), 1,74 – 1,61 (m, 2H, H-4). **^{13}C NMR (101 MHz, D₂O) δ** 178,72 (C-1), 169,30 (C-1'), 161,91 (C-5'), 156,62 (C-6), 129,09 (C-3' e C-7'), 125,72 (C-2'), 113,88 (C-4' e C-6'), 55,41 (OMe), 55,14 (C-2), 40,63 (C-5), 28,87 (C-3), 24,55 (C-4). **ESI-HRMS:** calculado para C₁₄H₂₁N₄O₄ [M]⁺ 309,15631, encontrado 308,15576.

IV.2.2.3. Síntese de *N^α-(E)-(3-fenil)acrilóil*-L-arginina (**2c**)

Nesta reação o reagente limitante foi o ácido cinâmico (**4c**). De acordo com o procedimento geral descrito em 1.2.1 dissolveu-se 500 mg (3,37 mmol, 1 eq) de ácido cinâmico (**4c**) em 5 mL de DCM seco e adicionou-se 657 mg (4,05 mmol, 1,2 eq) de CDI.

A seguir, fez-se reagir o crude obtido com 38 mg (0,34 mmol, 0,1 eq) de DMAP e 880 mg (5,06 mmol, 1,5 eq) de L-arginina (**1**), em 10 mL de DMF seco. A reação ocorreu durante 72 h. Acompanhou-se por TLC, eluição com



DCM/MeOH (4:1) e revelação com UV (254 nm), e reagentes de Dragendorff e de ninidrina.

Destilou-se o DMF. Suspendeu-se o crude em 10 mL de HCl 0,1 M. Com o intuito de remover o imidazole, extraiu-se com 6 x 15 mL de DCM, basificou-se até pH 9 e extraiu-se com 2 x 25 mL de Et₂O. A fase aquosa foi evaporada à secura. O crude foi separado por cromatografia em coluna de sílica RP-18 nas condições descritas no procedimento geral em 1.2.1. Obteve-se 379 mg (1,25 mmol) de um sólido branco com rendimento de 37%.

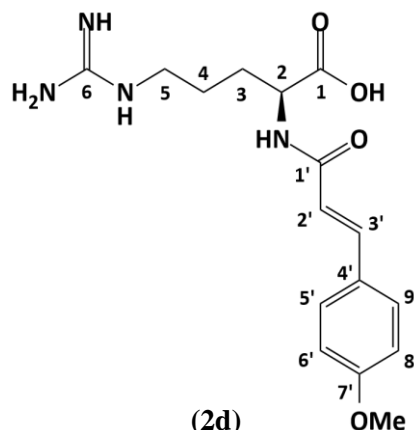
Dados espectroscópicos de acordo com o descrito em 1.1.3.

IV.2.2.4. Síntese de *N^α-(E)-(3-(p-metoxifenil)acrilóil*-L-arginina (**2d**)

De acordo com o procedimento geral descrito em 1.2.1, fez-se reagir 500 mg (2,8 mmol, 1 eq) de ácido (*E*)-3-(*p*-metoxifenil)acrílico (ácido *p*-metoxicinâmico) (**4d**) em 10 mL de DCM seco com 546 mg (3,4 mmol, 1,2 eq) de CDI.

Adicionou-se 34 mg de DMAP (0,28 mmol, 0,1 eq) e de seguida 732 mg (4,2 mmol, 1,5 eq) de *L*-arginina (**1**). Deixou-se reagir durante 48 h. Adicionou-se mais 15 mL de DMF seco e deixou-se reagir por mais 24 h.

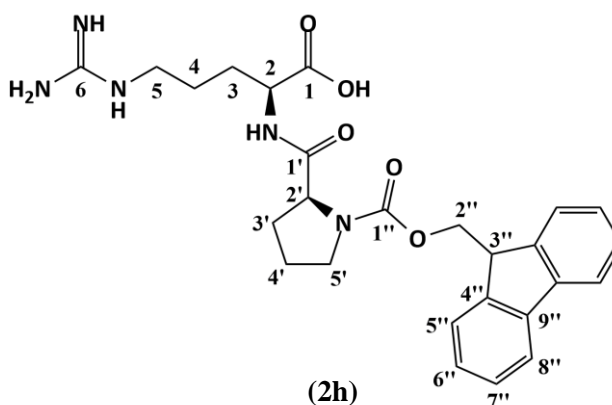
Antes de se purificar, filtrou-se o precipitado (*L*-arginina). Obtiveram-se 517 mg (1,54 mmol) de *N*^α-(*E*)-(3-(*p*-metoxifenil)acrilóil)-*L*-arginina (**2d**) com rendimento de 55%.



P.f. 112-115 °C. **IV (ATR) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹)** 3400-2900 (N-H, N-H amida *bonded*, C(=O)O-H *bonded*, C-H), 1638 (C=O amida I), 1605(amida I), 1573(C=C conjugada), 1510 (amida II), 1394, 1251 (=C-OCH₃). **¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ** 7,38 – 7,27 (m, 3H, H-3'e, H-5' e H-9'), 6,80 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H-6' e H-8'), 6,48 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H, H-2'), 4,36 (dd, *J* = 8,0, 4,8 Hz, 1H, H-2), 3,72 (s, 3H, OMe), 3,20 – 3,04 (m, 2H, H-5), 1,93 – 1,79 (m, 1H, H-3a), 1,77 – 1,64 (m, 1H, H-3b), 1,65 – 1,53 (m, 2H, H-4). **¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ** 179,18 (C-1), 168,46 (C-1'), 162,48 (C-7'), 158,71 (C-6), 141,32 (C-3'), 130,48 (C-5' e C-9'), 128,91 (C-4'), 119,70 (C-2'), 115,26 (C-6' e C-8'), 55,83 (OMe), 42,06 (C-5), 31,19 (C-3), 26,32 (C-4). **ESI-HRMS:** calculado para C₁₆H₂₃N₄O₄ [M]⁺ 335,17196, encontrado 335,17167.

IV.2.2.5. Síntese de (*S*)-1-(9-fluorenilmetoxycarbonil)prolil-*L*-arginina (**2h**)

Dissolveu-se 426 mg (1,27 mmol, 1,1 eq) de Fmoc-L-prolina (**4h**) em 5 mL de DMF seco. Adicionou-se 285 mg (1,38 mmol, 1,2 eq) de DCC e deixou-se reagir em atmosfera inerte durante 10 min. Adicionou-se 200 mg (1,15 mmol, 1 eq) de *L*-arginina. A reação decorreu durante 48h.



Evaporou-se o solvente e lavou-se o crude com DCM. O filtrado foi evaporado à secura e separado em coluna de sílica RP-18 nas condições descritas no procedimento geral 1.2.1. Não foi possível identificar o produto nas frações enviadas para análise de ¹H RMN.

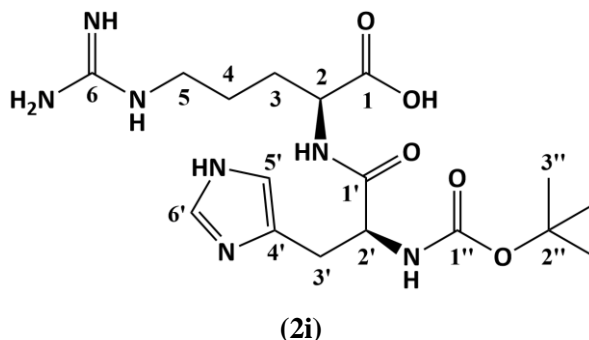
IV.2.2.6. Síntese de (*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)histidinil-*L*-arginina (**2i**)

De acordo com o procedimento geral em 1.2.1, a 322 mg (1,26 mmol, 1,1 eq) de Boc-*L*-histidina (**4i**), em 10 mL de DCM seco, adicionou-se 224 mg (1,38 mmol, 1,2 eq) de CDI. A reação decorreu durante 1 h.

Evaporou-se o DCM e adicionou-se 10 mL de DMF seco e fez-se reagir com 224 mg (1,15 mmol, 1 eq) de *L*-arginina. A reação decorreu durante 48 h.

Obteve-se 149 mg de (*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonil)histidinil-*L*-arginina (**2i**) num rendimento de 31%.

¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 7,73 (s, 1H, H-6'), 6,97 (s, 1H, H-5'), 4,37 – 4,29 (m, 1H, H-2'), 4,18 (dd, *J* = 12,4, 5,0 Hz, 1H, H-2), 3,27 – 3,12 (m, 2H, H-5), 3,12 – 3,02 (m, 1H, H-3'a), 3,00 – 2,90 (m, 1H, H-3'b), 1,93 – 1,78 (m, 1H, H-3a), 1,76 – 1,62 (m, 1H, H-3b), 1,62 – 1,48 (m, 2H, H-4), 1,38 (s, 9H, H-3'').



IV.3. Reações de descarboxilação oxidativa

IV.3.1. Com o par DIB/I₂

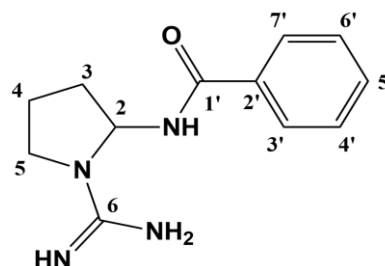
IV.3.1.1. Procedimento geral

Num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, adicionou-se a L-arginina N^α-derivatizada (**2**) e o solvente seco. Adicionou-se 4 eq de DIB e 1 eq de I₂. A reação decorreu em atmosfera inerte e sob refluxo. Monitorizou-se por *TLC*, eluindo com DCM/MeOH/H₂O 13:7:1 e revelando com UV (254 nm) e reagente de Dragendorff.

Evaporou-se o solvente e o crude foi purificado em coluna de fase reversa RP-18, com eluição com misturas de água e metanol, decrescendo de polaridade de 10 em 10%, começando com 0% até 50% de metanol, 50 mL de cada mistura. Os tubos recolhidos foram analisados por UV-Vis e os semelhantes foram juntos e evaporados à secura.

IV.3.1.2. Síntese de *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (**2a**)

Obtido de acordo com o procedimento geral descrito em 2.1.1 partindo de 100 mg (0,36 mmol) de N^α-benzoil-L-Arginina (**2a**) e usando 5 mL de DCM. A *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (**3a**) foi obtido com 7% de rendimento.



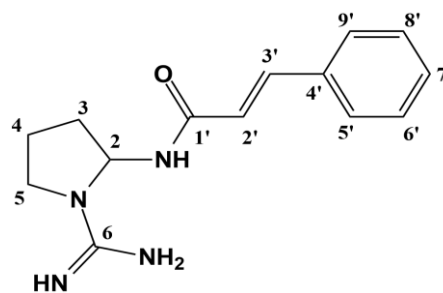
(**2a**)

Decomposição térmica 255 °C. **IV (ATR) v_{máx} (cm⁻¹)**

3200-3000 (N-H), 3059 (=C-H), 1667, 1641 (C=O amida I), 1603 (C=C), 1490 (C=C), 1356, 1278, 1090 (C-N), 1054 (C-N). **¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ** 7,63 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H, H-3' e H-7'), 7,57 – 7,45 (m, 1H, H-5'), 7,40 (m, 2H, H-4' e H-6'), 5,77 (m, 1H, H-2), 3,55 – 3,46 (m, 1H, H-5a), 3,37 – 3,28 (m, 1H, H-5b), 2,29 – 2,09 (m, 2H, H-3), 2,08 – 1,98 (m, 2H, H-4). **ESI-HRMS:** calculado para C₁₂H₁₇N₄O [M]⁺ 233,14025, encontrado 233,13931

IV.3.1.3. Síntese de (*E*)-*N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-(3-fenil)acrilamida (**3c**)

Partindo de 50 mg (0,16 mmol, 1 eq) de N^α-cinamoil-L-Arginina (**2c**) em 10 mL de AcOH/DCM 3:1. A reação decorreu de acordo com o procedimento geral descrito em 2.1.1. Após 3 h e 30 min, verificou-se o consumo do reagente de partida e adicionou-se mais 0,5 eq de I₂, ficando a reagir por mais 72 h.

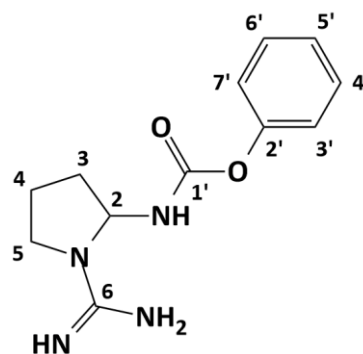


(**3c**)

Evaporou-se à secura e enviou-se uma alíquota para análise de ^1H RMN. Não se procedeu à purificação pois não foi possível identificar o produto no crude reacional.

IV.3.1.4. Síntese de fenil (1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)carbamato (**3g**)

Partiu-se de 50 mg (0,16 mmol, 1 eq) de N^α -fenoxycarbonil-L-arginina (**2g**), em 5 mL de DCM seco. A reação decorreu de acordo com o procedimento geral descrito em 2.1.1 durante 24 h a refluxo. O composto fenil (1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)carbamato (**3g**) foi obtido com 15% de rendimento.



^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,43 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H, H-4' e H-6'), 7,29 (t, $J = 7,4$ Hz, 1H, H-5'), 7,13 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, H-3' e H-7'), 5,65 – 5,53 (m, 1H, H-2), 3,65 – 3,57 (m, 1H, H-5a), 3,48 – 3,39 (m, 1H, H-5b), 2,41 – 2,07 (m, 4H, H-3 e H-4).

IV.3.2. Com o par $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e CuSO_4

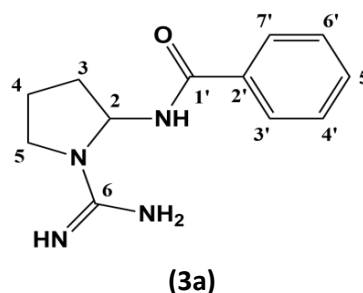
IV.3.2.1. Procedimento geral

Com base no processo de Huang *et al.*⁵⁹, num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se a L-arginina *N*^α-derivatizada (**2**) em H_2O , que corresponde a concentração 0,036 M. Adicionou-se 1 eq de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,15 eq de AgNO_3 , e 1,5 eq de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, nesta ordem. A reação ocorreu em atmosfera inerte e a 60 °C. Acompanhou-se por *TLC*, tendo como eluente DCM/MeOH/ H_2O 13:7:1 e revelação com UV (254 nm) e reagente de Dragendorff.

A mistura reacional foi purificada em coluna de fase reversa RP-18, com eluição com misturas de água e metanol, decrescendo de polaridade de 10 em 10%, começando com 0% até 50% de metanol, 50 mL cada mistura. Os tubos recolhidos foram analisados por UV-Vis e os que apresentavam espectros semelhantes foram juntos e evaporados à secura.

IV.3.2.2. Síntese de *N*-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)benzamida (**3a**)

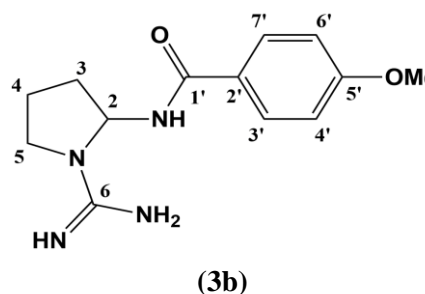
De acordo com o procedimento geral e partindo de 50 mg (0,18 mmol, 1 eq) de *N*^α-Benzoíl-L-arginina (**2a**) a reação decorreu durante 0,5 h tendo-se obtido *N*-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)benzamida (**3a**) com rendimento de 72%. Dados espectroscópicos de acordo com o descrito em 2.1.2.



IV.3.2.3. Síntese de *N*-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)-4-metoxibenzamida (**3b**)

De acordo com o procedimento geral e partindo de 50 mg (0,16 mmol, 1 eq) de *N*^α-*p*-metoxibenzoíl-L-arginina (**2b**) a reação decorreu durante 0,5 h tendo-se obtido *N*-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)-4-metoxibenzamida.

(**3b**) com rendimento de 80%.

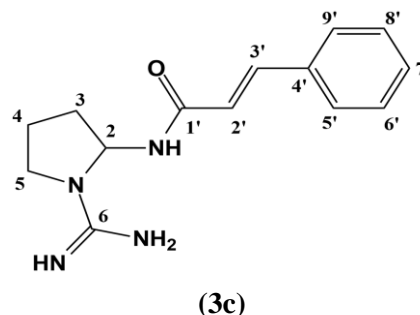


Decomposição térmica 150°C. ¹H RMN (400 MHz,

D₂O) δ 7,57 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-3' e H-7'), 6,87 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H-4' e H-6'), 5,75 – 5,64 (m, 1H, H-2), 3,73 (s, 3H, OMe), 3,54 – 3,44 (m, 1H, H-5a), 3,38 – 3,28 (m, 1H, H-5b), 2,27 – 2,09 (m, 2H, H-3), 2,08 – 1,94 (m, 2H, H-4). **ESI-HRMS**: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 263,15082, encontrado 263,15068

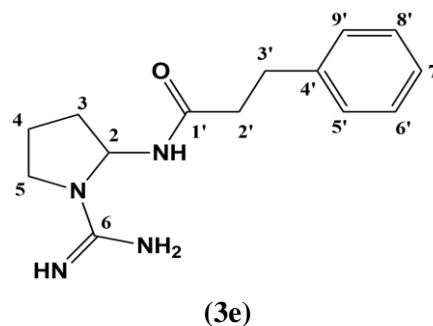
IV.3.2.4. Síntese de *(E)*-*N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-(3-fenil)acrilamida (**3c**)

De acordo com o procedimento geral em 2.2.1, partindo de 50 mg (0,16 mmol, 1 eq) de *N*^α-(*E*)-(3-fenil)acrilóil-*L*-arginina (**2c**). Não foi possível identificar a presença de *(E)*-*N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-(3-fenil)acrilamida (**3c**).



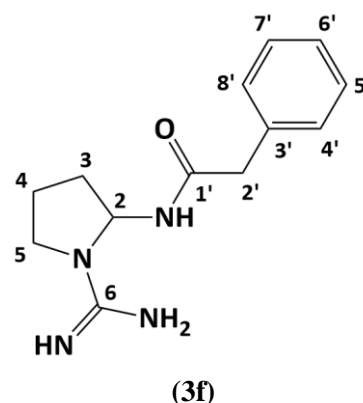
IV.3.2.5. Síntese de *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-fenilpropanamida (**3e**)

De acordo com o procedimento geral em 2.2.1, partindo de 50 mg (0,16 mmol, 1 eq) de *N*^α-(3-fenilpropanil)-*L*-arginina (**2e**). Não foi possível identificar a presença de *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-3-fenilpropanamida (**3e**).



IV.3.2.6. Síntese de *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)-2-fenilacetamida (**3f**)

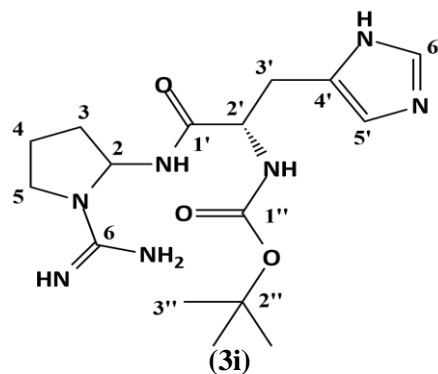
Reação feita de acordo com o procedimento geral em 2.2.1. A reação ficou *overnight*, durando aproximadamente 18 h. Após se parar a reação enviou-se uma alíquota para análise de ¹H RMN. Não se procedeu à purificação porque não foi possível identificar o produto desejado na mistura reacional.



IV.3.2.7. Síntese de *tert*-butil ((2*S*)-1-((1-carbamimidolpirrolidin-2-il)amino)-3-(1*H*-imidazol-5-il)-1-oxopropan-2-il)carbamato (**3i**)

Fez-se a reação de acordo com o procedimento geral, partindo de 50 mg (0,12 mmol, 1 eq) de (**2i**). A reação decorreu durante 2 h.

Após separação em coluna, obtiveram-se 20 mg de uma mistura entre o produto de partida e outro produto, que não se confirmou ser (**3i**), numa proporção de 3,8:1.

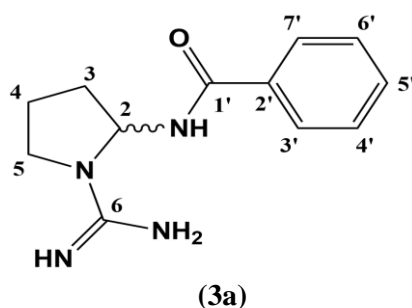


IV.3.3. Com $\text{AgNO}_3/(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8^{2-}/\text{CuSO}_4$ e ligandos quirais

IV.3.3.1. Procedimento geral

O procedimento geral para a síntese destes compostos é igual ao descrito em 4.2.2.1, com a diferença de que se adicionou o CuSO_4 (1 eq) em primeiro lugar, seguido do ligando quiral (1 eq), em H_2O . Deixou-se sob agitação e à temperatura de 60 °C. Após 10 min, adicionou-se 1 eq de arginina derivatizada (**2**), 0,15 eq de AgNO_3 e 1,5 eq de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e deixou-se reagir nas mesmas condições. A concentração de (**2**) foi de 0,036 M. Monitorizou-se a reação por *TLC*, eluindo com $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 13:7:1 e revelando com reagente de Dragendorff e reagente de ninidrina. A purificação foi feita em coluna de sílica RP-18, como descrito em 2.2.1.

IV.3.3.2. Síntese de *N*-(1-carbamimidóilpirrolidin-2-il)benzamida (**3a**)



Método A

O ligando usado foi (\pm)-dihidrocinchonina. De acordo com o procedimento geral em 4.2.3.1, colocou-se 18 mg (0,072 mmol, 1 eq) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 2 mL de H_2O e adicionou-se 21 mg (0,072 mmol) do ligando. Fez-se reagir com 20 mg (0,072 mmol) de *N*^α-Benzoil-*L*-arginina (**2a**), 1,8 mg de AgNO_3 e 25 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. A reação demorou 30 min. A mistura reacional apresentava uma cor castanha. A purificação foi feita de acordo com o procedimento geral em 4.2.2.1. No espectro de ^1H RMN identificou-se o produto (**3a**) mas não se conseguiu obtê-lo puro.

Método B

O ligando utilizado foi (+)-cinchonina e, de acordo com o procedimento geral em 4.2.3.1, utilizou-se 100 mg (0,36 mmol) de (**2a**). A reação adquiriu rapidamente cor castanha após se adicionar o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Parou-se a reação após 25 h. Deixou-se repousar durante 48 h. Filtrou-se o precipitado. O filtrado foi separado em coluna de sílica RP-18 nas condições descritas em 4.2.2.1. Fez-se nova purificação de uma das frações por *TLC* preparativa em placa de vidro. Como não se conseguiu purificar fez-se nova preparativa. Ambas foram eluídas com $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 13:7:1. Obteve-se 9,3 mg, com rendimento de 11 %, de um sólido branco que se confirmou ser o produto (**3a**). A medição da rotação ótica mostrou que o produto obtido é um racemato, $[\alpha]_{240}^{22} = 0$.

Método C

O ligando utilizado foi (\pm)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftaleno ((\pm)-BINAP). De acordo com o procedimento geral em 2.3.1, fez-se reagir 50 mg (0,18 mmol) de (**2a**), numa solução de 10 mL de H₂O/CH₃CN 1:1. Após 48 h de reação adicionou-se mais 1,5 eq de (NH₄)₂S₂O₈ e deixou-se reagir mais 24 h. Extraíu-se com 10 mL de DCM para remover os componentes apolares. A fase aquosa foi purificada em coluna de sílica RP-18 nas condições descritas. Obteve-se 21,4 mg, com rendimento de 51 %, de (**3a**). A rotação ótica confirmou ser um racemato.

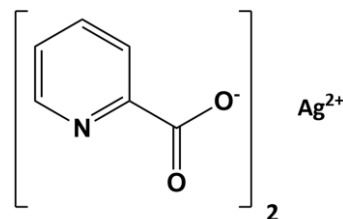
Método D

O ligando utilizado foi o (+)-1,1'-bi-2-naftol ((+)-BINOL). De acordo com o procedimento geral em 4.2.3.1, fez-se reagir 50 mg (0,18mmol) de (**2a**). Adicionou-se mais 1,5 eq de (NH₄)₂S₂O₈ após 24 h de reação e a reação continuou por mais 24 h. Filtrou-se o precipitado. O filtrado foi extraído com 10 mL de DCM para remover os componentes apolares. A fase aquosa foi separada em coluna de sílica RP-18, nas condições descritas em 4.2.2.1. Não se conseguiu obter o produto pretendido nem identificá-lo nas frações recolhidas em quantidades apreciáveis.

IV.3.4. Com picolinato de prata (II)

IV.3.4.1. Síntese do picolinato de prata (II)

Dissolveu-se 200 mg (1,6 mmol, 1 eq) de ácido picolínico em 2 mL de H₂O. Adicionou-se 138 mg (0,8 mmol, 0,5 eq) de AgNO₃ e 93 mg (0,4 mmol, 0,25 eq) de (NH₄)₂S₂O₈. Deixou-se reagir por 48 h à temperatura ambiente e em atmosfera inerte. O precipitado laranja que se formou foi filtrado e seco. Analisou-se por FTIR (ATR) e UV. No UV identificaram-se as bandas correspondentes a 215 nm e 325 nm.



IV.3.4.2. Síntese de *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (**3a**)

Adicionou-se 5 mL de DCM seco a 50 mg (0,18 mmol, 1 eq) de *N*^α-Benzoíl-*L*-arginina (**2a**) e de seguida 127 mg (0,36 mmol, 2 eq) de picolinato de prata (II). A reação procedeu à temperatura ambiente, sob agitação vigorosa e atmosfera inerte. Após 48 h não se verificou alterações por isso evaporou-se o DCM e adicionou-se 10 mL de H₂O. Após se verificar o desaparecimento da cor laranja da mistura reacional, filtrou-se o crude e desprezou-se o precipitado. Extraíu-se o filtrado com 4 x 5 mL de DCM para remover o ácido picolínico. A fase aquosa foi evaporada à secura e enviou-se uma alíquota para ¹H RMN. Não se procedeu à purificação uma vez que não se identificou o produto pretendido em quantidades apreciáveis.

IV.3.5. Com *N*-Bromosuccinimida (NBS)

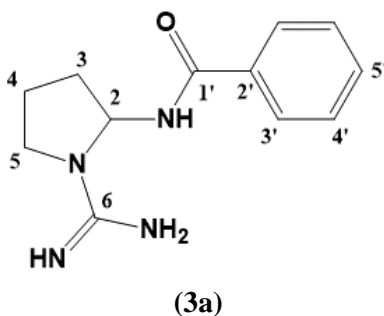
IV.3.5.1. Procedimento geral

Com base no procedimento de Golding *et al.*⁵³, num balão de fundo redondo, equipado com agitador magnético, dissolveu-se 50 mg (0,29 mmol, 1 eq) de *L*-arginina em 5 mL de H₂O e fez-se reagir com 3 eq de NBS. A reação ocorreu em atmosfera inerte. Acompanhou-se a reação por *TLC*, eluindo com DCM/MeOH/H₂O 13:7:1 e revelação com reagente de ninidrina.

Adicionou-se 1 eq do reagente acilante (**4**) e de Et₃N e deixou-se reagir em atmosfera inerte à temperatura ambiente.

Após se parar a reação, acidificou-se até pH 1 com HCl 3 M e extraiu-se com Et₂O, 3 x 10 mL. Basificou-se até pH 12 e extraiu-se novamente com Et₂O, 3 x 10 mL. A fase aquosa foi evaporada à secura. Separou-se o crude em coluna de sílica RP-18, com eluição com misturas de água e metanol, decrescendo de polaridade de 10 em 10%, começando com 0% até 50% de metanol, 50 mL cada mistura. As frações recolhidas foram evaporadas à secura e enviadas para análise de ¹H RMN.

IV.3.5.2. Síntese de *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (**3a**)



De acordo com o procedimento geral anterior, não foi possível obter o produto *N*-(1-carbamimidoilpirrolidin-2-il)benzamida (**3a**).

V. Referências

- (1) Lahlou, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacol. & Pharm.* **2013**, 04 (03), 17–31. <https://doi.org/10.4236/pp.2013.43a003>.
- (2) Huffman, B. J.; Shenvi, R. A. Natural Products in the “Marketplace”: Interfacing Synthesis and Biology. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141 (8), 3332–3346. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11297>.
- (3) Thomford, N. E.; Senthebane, D. A.; Rowe, A.; Munro, D.; Seele, P.; Maroyi, A.; Dzobo, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>.
- (4) Bharadwaj, K. C.; Gupta, T.; Singh, R. M. *Alkaloid Group of Cinchona Officinalis : Structural, Synthetic, and Medicinal Aspects*; Elsevier Ltd, 2018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102071-5.00009-x>.
- (5) Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14 (2), 111–129. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>.
- (6) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79 (3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- (7) Li, J. W.; Vederas, J. C. Drug Discovery and Natural Products : *Science* (80-.). **2009**, 325 (5935), 161–165. <https://doi.org/10.1126/science.1168243>.
- (8) Isgut, M.; Rao, M.; Yang, C.; Subrahmanyam, V.; Rida, P. C. G.; Aneja, R. Application of Combination High-Throughput Phenotypic Screening and Target Identification Methods for the Discovery of Natural Product-Based Combination Drugs. *Med. Res. Rev.* **2018**, 38 (2), 504–524. <https://doi.org/10.1002/med.21444>.
- (9) Cragg M., G.; Grothaus G., P.; Newman j., D. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents †. *Chem. Rev.* **2009**, No. May, 3012–3043.
- (10) Lopes, L. C.; De Carvalho, J. E.; Kakimore, M.; Vendramini-Costa, D. B.; Medeiros, M. A.; Spindola, H. M.; Ávila-Román, J.; Lourenço, A. M.; Motilva, V. Pharmacological Characterization of Solanum Cernuum Vell.: 31-Norcycloartanones with Analgesic and Anti-Inflammatory Properties. *Inflammopharmacology* **2014**, 22 (3), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0182-8>.
- (11) Damasceno, J. L.; de Oliveira, P. F.; Miranda, M. A.; Lima, M.; Bastos, J. K.; Tavares, D. C. Antigenotoxic and Antioxidant Properties of <I>Solanum Cernuum</I> C.

- and Its Alkaloid, Cernumidine. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, *39* (6), 920–926. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00638>.
- (12) Lopes, L. C.; Roman, B.; Medeiros, M. A.; Mukhopadhyay, A.; Utrilla, P.; Gálvez, J.; Mauriño, S. G.; Moltiva, V.; Lourenço, A.; Feliciano, A. S. Cernumidine and Isocernumidine, New Type of Cyclic Guanidine Alkaloids from *Solanum Cernuum*. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (48), 6392–6395. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.09.060>.
 - (13) Brew, R.; Erikson, J. S.; West, D. C.; Kinsella, A. R.; Slavin, J.; Christmas, S. E. Interleukin-8 as an Autocrine Growth Factor for Human Colon Carcinoma Cells in Vitro. *Cytokine* **2000**, *12* (1), 78–85. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0518>.
 - (14) Li, A.; Varney, M. L.; Singh, R. K. Expression of Interleukin 8 and Its Receptors in Human Colon Carcinoma Cells with Different Metastatic Potentials 1. **2001**, *7* (October), 3298–3304.
 - (15) Doll, D.; Keller, L.; Maak, M. Differential Expression of the Chemokines GRO-2 , GRO-3 , and Interleukin-8 in Colon Cancer and Their Impact on Metastatic Disease and Survival. **2010**, 573–581. <https://doi.org/10.1007/s00384-010-0901-1>.
 - (16) Ascenzi, P.; Fasano, M.; Marino, M.; Venturini, G.; Federico, R. Agmatine Oxidation by Copper Amine Oxidase. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269* (3), 884–892. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2002.02718.x>.
 - (17) Boto, A.; Hernández, R.; Suárez, E. Oxidative Decarboxylation of α -Amino Acids: A Mild and Efficient Method for the Generation of N-Acyliminium Ions. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (32), 5945–5948. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)01180-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)01180-6).
 - (18) Silva, S. B. L.; Oberhänsli, F.; Tribalat, M. A.; Genta-Jouve, G.; Teyssié, J. L.; Dechraoui-Bottein, M. Y.; Gallard, J. F.; Evanno, L.; Poupon, E.; Thomas, O. P. Insights into the Biosynthesis of Cyclic Guanidine Alkaloids from Crambeidae Marine Sponges. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58* (2), 520–525. <https://doi.org/10.1002/anie.201809539>.
 - (19) Morris, S. M. Arginine: Beyond Protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83* (2), 508S–512S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.508S>.
 - (20) Fitch, C. A.; Platzer, G.; Okon, M.; E, B. G.; McIntosh, L. P. Arginine : Its p K a Value Revisited. **2015**, *24*, 752–761. <https://doi.org/10.1002/pro.2647>.
 - (21) Willson, C. Arginine. *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.* **2011**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.63670-0>.
 - (22) McRae, M. P. Therapeutic Benefits of L-Arginine: An Umbrella Review of Meta-

- Analyses. *J. Chiropr. Med.* **2016**, *15* (3), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.06.002>.
- (23) Groneberg, D. A.; Fischer, A. *Neuropeptides*; 2009; Vol. 1. <https://doi.org/10.1002/9781444300918.ch23>.
- (24) Magnuson, B. A.; Burdock, G. A.; Doull, J.; Kroes, R. M.; Marsh, G. M.; Pariza, M. W.; Spencer, P. S.; Waddell, W. J.; Walker, R.; Williams, G. M. Aspartame: A Safety Evaluation Based on Current Use Levels, Regulations, and Toxicological and Epidemiological Studies. *Crit. Rev. Toxicol.* **2007**, *37* (8), 629–727. <https://doi.org/10.1080/10408440701516184>.
- (25) Long, A. J.; Clifton, I. J.; Roach, P. L.; Baldwin, J. E.; Rutledge, P. J.; Schofield, C. J. Structural Studies on the Reaction of Isopenicillin N Synthase with the Truncated Substrate Analogues δ -(L- α -Aminoadipoyl)-L-Cysteinyl- Glycine and δ -(L- α -Aminoadipoyl)-L-Cysteinyl-D-Alanine. *Biochemistry* **2005**, *44* (17), 6619–6628. <https://doi.org/10.1021/bi047478q>.
- (26) Santos, S.; Torcato, I.; Castanho, M. Biomedical Applications of Dipeptides and Tripeptides. *Biopolymers* **2012**, *98* (4), 288–293. <https://doi.org/10.1002/bip.22067>.
- (27) Kastin, A. *Handbook of Biologically Active Peptides*; 2013. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-66490-X>.
- (28) Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids* **2018**, *50* (1), 39–68. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2516-0>.
- (29) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V.; Park, M.; Ox, A. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (740), 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>.
- (30) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation : Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, No. 2, 606–631. <https://doi.org/10.1039/b701677h>.
- (31) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. Organic Chemistry. In *Organic Chemistry*; Press, O. U., Ed.; 2001; pp 294–296.
- (32) Jonathan Clayden, Nick Greeves, S. G. W. *Organic Chemistry*, 2nd ed.; Press, O. U., Ed.; 2012. <https://doi.org/10.1007/s00897010513a>.
- (33) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**. <https://doi.org/10.1021/ja01609a099>.

- (34) Sheehan, J. C.; Hlavka, J. J. The Use of Water-Soluble and Basic Carbodiimides in Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.* **1956**, *21* (4), 439–441. <https://doi.org/10.1021/jo01110a017>.
- (35) KOENIG, W.; GEIGER, R. ChemInform Abstract: SYNTH. VON PEPTIDEN, AKTIVIERUNG DER CARBOXYLGRUPPE MIT DICYCLOHEXYLCARBODIIMID UND 3-HYDROXY-4-OXO-3,4-DIHYDRO-1,2,3-BENZOTRIAZIN. *Chem. Informationsdienst. Org. Chemie* **1970**. <https://doi.org/10.1002/chin.197039340>.
- (36) Carpino, L. A. An Efficient Peptide Coupling Additive'. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (13), 4397–4398.
- (37) Vaidyanathan, R.; Kalthod, V. G.; Ngo, D. P.; Manley, J. M.; Lapekas, S. P. Amidations Using N,N'-Carbonyldiimidazole: Remarkable Rate Enhancement by Carbon Dioxide. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (7), 2565–2568. <https://doi.org/10.1021/jo049949k>.
- (38) Ojeda-Porras, A.; Gamba-Sánchez, D. Recent Developments in Amide Synthesis Using Nonactivated Starting Materials. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (23), 11548–11555. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02358>.
- (39) Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. Rethinking Amide Bond Synthesis. *Nature* **2011**, *480* (7378), 471–479. <https://doi.org/10.1038/nature10702>.
- (40) Ishihara, K.; Ohara, S. 3,4,5-Trifluorobenzenboronic Acid as an Extremely Active Amidation Catalyst. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4196–4197.
- (41) Bode, J. W.; Sohn, S. S. N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed Redox Amidations of α -Functionalized Aldehydes with Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13798–13799. <https://doi.org/10.1021/ja0768136>.
- (42) Vora, H. U.; Rovis, T. Nucleophilic Carbene and HOAt Relay Catalysis in an Amide Bond Coupling: An Orthogonal Peptide Bond Forming Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13796–13797. <https://doi.org/10.1021/ja0764052>.
- (43) Chiang, P. C.; Kim, Y.; Bode, J. W. Catalytic Amide Formation with α' -Hydroxyenones as Acylating Reagents. *Chem. Commun.* **2009**, No. 30, 4566–4568. <https://doi.org/10.1039/b909360e>.
- (44) Gunanathan, C.; Ben-David, Y.; Milstein, D. Direct Synthesis of Amides from Alcohols and Amines with Liberation of H₂. *Science* (80-.). **2007**. <https://doi.org/10.1126/science.1145295>.
- (45) Silverman, R. B.; Zhou, J. J. P.; Ding, C. Z.; Lu, X. Monoamine Oxidase-Catalyzed Oxidative Decarboxylation of Cis- and Trans-5-Aminomethyl-3-(4-

- Methoxyphenyl)Dihydrofuran-2(3H)-One. Evidence for the Intermediacy of an α -Radical. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (51), 12895–12896. <https://doi.org/10.1021/ja00156a042>.
- (46) Boto, A.; Hernández, R.; Suárez, E. Synthesis of Alkaloids from Amino Acids via N-Acyliminium Ions Generated by One-Pot Radical Decarboxylation-Oxidation. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (16), 2899–2902. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00306-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00306-3).
- (47) Boto, A.; Hernández, R.; Suárez, E. Tandem Radical Decarboxylation-Oxidation of Amino Acids: A Mild and Efficient Method for the Generation of N-Acyliminium Ions and Their Nucleophilic Trapping. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (16), 4930–4937. <https://doi.org/10.1021/jo000356t>.
- (48) Boto, A.; Hernández, R.; de León, Y. Suárez, E. Synthesis of 2,3-Disubstituted Pyrrolidines and Piperidines via One-Pot Oxidative Decarboxylation- β -Iodination of Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (23), 7796–7803. <https://doi.org/10.1021/jo015877a>.
- (49) Fan, R.; Li, W.; Wang, B. A One-Pot Oxidative Decarboxylation-Friedel-Crafts Reaction of Acyclic α -Amino Acid Derivatives Activated by the Combination of Iodobenzene Diacetate/Iodine and Iron Dust. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (24), 4615–4621. <https://doi.org/10.1039/b815227f>.
- (50) Bellale, E. V.; Huddar, S. N.; Mahajan, U. S.; Akamanchi, K. G. Oxidative Decarboxylation of α -Amino Acids to Nitriles Using o-Iodoxybenzoic Acid in Aqueous Ammonia. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (3), 607–612. <https://doi.org/10.1351/pac-con-10-09-15>.
- (51) Claes, L.; Matthessen, R.; Rombouts, I.; Stassen, I.; De Baerdemaeker, T.; Depla, D.; Delcour, J. A.; Lagrain, B.; De Vos, D. E. Bio-Based Nitriles from the Heterogeneously Catalyzed Oxidative Decarboxylation of Amino Acids. *ChemSusChem* **2015**, *8* (2), 345–352. <https://doi.org/10.1002/cssc.201402801>.
- (52) Matthessen, R.; Claes, L.; Fransaer, J.; Binnemans, K.; De Vos, D. E. Decarboxylation of a Wide Range of Amino Acids with Electrogenenerated Hypobromite. *European J. Org. Chem.* **2014**, *2014* (30), 6649–6652. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201403112>.
- (53) Laval, G.; Golding, B. T. One-Pot Sequence for the Decarboxylation of α -Amino Acids. *Synlett* **2003**, *4* (4), 0542–0546. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37512>.
- (54) Bacon, R. G. R.; Hanna, W. J. W.; Stewart, D. Oxidation by Persulphate. Part V. Silver-Catalysed Oxidation of Secondary Aliphatic Amines and α -Amino-Acids. *J. Chem. Soc.*

COrganic **1966**, No. 1388.

- (55) Anderson, J. M.; Kochi, J. K. Silver (I)-Catalyzed Oxidative Decarboxylation of Acids by Peroxydisulfate. the Role of Silver (II). *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92 (6), 1651–1659. <https://doi.org/10.1021/ja00709a039>.
- (56) Fristad, W. E.; Fry, M. A.; Klang, J. A. Persulfate/Silver Ion Decarboxylation of Carboxylic Acids. Preparation of Alkanes, Alkenes, and Alcohols. *J. Org. Chem.* **1983**, 48 (20), 3575–3577. <https://doi.org/10.1021/jo00168a047>.
- (57) Clarke, T. G.; Hampson, N. A.; Lee, J. B.; Scanlon, B. Oxidations Involving Silver. Part VI.1 Oxidation of α -Amino-Acids and α -Amino-Esters with Silver(II) Picolinate and Silver(II) Oxide. *J. Chem. Soc. C* **1969**, 815–817.
- (58) Zelechonok, Y.; Silverman, R. B. Silver(I)/Peroxydisulfate-Induced Oxidative Decarboxylation of Amino Acids. A Chemical Model for a Possible Intermediate in the Monoamine Oxidase-Catalyzed Oxidation of Amines. *J. Org. Chem.* **1992**, 57 (21), 5787–5790. <https://doi.org/10.1021/jo00047a045>.
- (59) Huang, W.; Wang, M.; Yue, H. Conversion of N-Acyl Amino Acids into Imides via Oxidative Decarboxylation Induced by Ag⁺/Cu²⁺/S₂O₈²⁻ in Water. *Synthesis (Stuttg)*. **2008**, No. 9, 1342–1344. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1072563>.
- (60) Cowden, C. J. Use of N-Protected Amino Acids in the Minisci Radical Alkylation. *Org. Lett.* **2003**, 3 (5), 27–29.
- (61) Yue, H.; Zhang, H.; Wang, M.; Huang, W. Novel Route to N-Acyl-N'-Formyl Amino Acids. *Synth. Commun.* **2009**, 39 (3), 484–491. <https://doi.org/10.1080/00397910802398256>.
- (62) Ruhemann, S. CXXXII. - Cyclic Di- and Tri-Ketones. *J. Chem. Soc. Trans.* **1910**. <https://doi.org/10.1039/CT9109701438>.
- (63) Bhagavan, N. V. Amino Acids. In *Medical Biochemistry*; 2002; p 31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416687-5.00003-8>.
- (64) Bottom, C. B.; Hanna, S. S.; Siehr, D. J. MECHANISM OF THE NINHYDRIN REACTION. *Biochem. Educ.* **1973**, 6 (1), 4–5. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(73\)80007-0](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(73)80007-0).
- (65) Harding, V. J.; MacLean, R. M. The Ninhydrin Reaction With Amines and Amides. *J. Biol. Chem.* **1916**, XXV (2), 337–350.
- (66) West, R. Siegfried Ruhemann and the Discovery of Ninhydrin. *J. Chem. Educ.* **1965**, 42 (7), 386–387.

- (67) Budavari, S. *The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals Eleventh Edition*; 1989.
- (68) Yalkowsky, S. H.; He, Y.; Jain, P. *Handbook of Aqueous Solubility Data*; 2010.
- (69) Hayashi, K.; Matsuda, T.; Takeyama, T.; Hino, T. Solubilities Studies of Basic Amino Acids. *Agric. Biol. Chem.* **1966**, 30 (4), 378–384. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.30.378>.
- (70) Cheng, L.; Ge, X.; Huang, L. Direct Amidation of Non-Activated Phenylacetic Acid and Benzylamine Derivatives Catalysed by NiCl₂. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, 5 (2). <https://doi.org/10.1098/rsos.171870>.
- (71) Moynihan, H. A.; Yu, W. Improved Selective Protections of L-Arginine. *Synth. Commun.* **1998**, 28 (1), 17–23. <https://doi.org/10.1080/00397919808005069>.
- (72) Jain, H. D.; Zhang, C.; Zhou, S.; Zhou, H.; Ma, J.; Liu, X.; Liao, X.; Deveau, A. M.; Dieckhaus, C. M.; Johnson, M. A.; et al. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies on Tryprostatin A, an Inhibitor of Breast Cancer Resistance Protein. *Bioorganic Med. Chem.* **2008**, 16 (8), 4626–4651. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.050>.
- (73) Bodanszky, M.; Deshmane, S. S.; Martinez, J. Side Reactions in Peptide Synthesis. 11.1 Possible Removal of the 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl Group by the Amino Components during Coupling. *J. Org. Chem.* **1979**, 44 (10), 1622–1625. <https://doi.org/10.1021/jo01324a008>.
- (74) Farrera-Sinfreu, J.; Royo, M.; Albericio, F. Undesired Removal of the Fmoc Group by the Free Gamma-Amino Function of a Lysine Residue. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43 (43), 7813–7815.
- (75) Hall Jr., H. K. Correlation of the Base Strengths of Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79 (20), 5441–5444.
- (76) Zhdankin, V. Hypervalent Iodine(III) Reagents in Organic Synthesis. *Arkivoc* **2009**, No. i, 1–62. https://doi.org/10.1007/b137171_98.
- (77) Kiyokawa, K.; Watanabe, T.; Fra, L.; Kojima, T.; Minakata, S. Hypervalent Iodine(III)-Mediated Decarboxylative Ritter-Type Amination Leading to the Production of α -Tertiary Amine Derivatives. *J. Org. Chem.* **2017**, 82 (22), 11711–11720. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b01202>.
- (78) Antonchick, A. P.; Samanta, R.; Kulikov, K.; Lategahn, J. Organocatalytic, Oxidative, Intramolecular C-H Bond Amination and Metal-Free Cross-Amination of Unactivated Arenes at Ambient Temperature. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, 50 (37), 8605–8608.

<https://doi.org/10.1002/anie.201102984>.

- (79) Du, L. H.; Wang, Y. G. A Rapid and Efficient Synthesis of Benzimidazoles Using Hypervalent Iodine as Oxidant. *Synthesis (Stuttg)*. **2007**, No. 5, 675–678. <https://doi.org/10.1055/s-2007-965922>.
- (80) Kiyokawa, K.; Okumatsu, D.; Minakata, S. Hypervalent Iodine(III)-Mediated Decarboxylative Acetoxylation at Tertiary and Benzylic Carbon Centers. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14* (Iii), 1046–1050. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.92>.
- (81) Gopalakrishnan, G.; Hogg, J. L. Kinetic and Mechanistic Studies of the N-Bromosuccinimide-Promoted Oxidative Decarboxylation of Glycine, DL-Alanine, and DL-Valine. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (8), 1206–1212. <https://doi.org/10.1021/jo00208a012>.
- (82) Clarke, T. G.; Hampson, N. A.; Lee, J. B.; Morley, J. R.; Scanlon, B. Oxidations Involving Silver. II. The Oxidation of Alcohols and Aldehydes with Silver(II) Picolinate. *Can. J. Chem.* **1969**, *47* (10), 1649–1654. <https://doi.org/10.1139/v69-271>.
- (83) Hua, A. M.; Mai, D. N.; Martinez, R.; Baxter, R. D. Radical C-H Fluorination Using Unprotected Amino Acids as Radical Precursors. *Org. Lett.* **2017**, *19* (11), 2949–2952. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b01188>.
- (84) Zuo, Z.; Macmillan, D. W. C. Decarboxylative Arylation of α -Amino Acids via Photoredox Catalysis: A One-Step Conversion of Biomass to Drug Pharmacophore Zhiwei Zuo and David W. C. MacMillan*. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5257.
- (85) Hamada, Y. Z.; Makoni, N.; Hamada, H. Cu²⁺ Complexes with the Simplest Amino Acid Glycine (Gly). *J. Nanomedicine Res.* **2017**, *5* (4), 2–7. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2017.05.00123>.
- (86) Martí, I.; Ferrer, A.; Escorihuela, J.; Burguete, M. I.; Luis, S. V. Copper(II) Complexes of Bis(Amino Amide) Ligands: Effect of Changes in the Amino Acid Residue. *Dalt. Trans.* **2012**, *41*, 6764–6776. <https://doi.org/10.1039/c2dt12459a>.
- (87) Jozwiuk, A.; Wang, Z.; Powell, D. R.; Houser, R. P. Copper (II) Complexes of Symmetric and Asymmetric Bis (Imine) Ligands : Tuning the Cu (I)/ Cu (II) Redox Couple. *Inorganica Chim. Acta* **2013**, *394*, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.08.026>.
- (88) Zervas, L.; Winitz, M.; Greenstein, J. P. Studies on Arginine Peptides. I. Intermediates in the Synthesis of N-Terminal and C-Terminal Arginine Peptides. *J. Org. Chem.* **1957**, *22* (11), 1515–1521. <https://doi.org/10.1021/jo01362a052>.

VI. Anexos

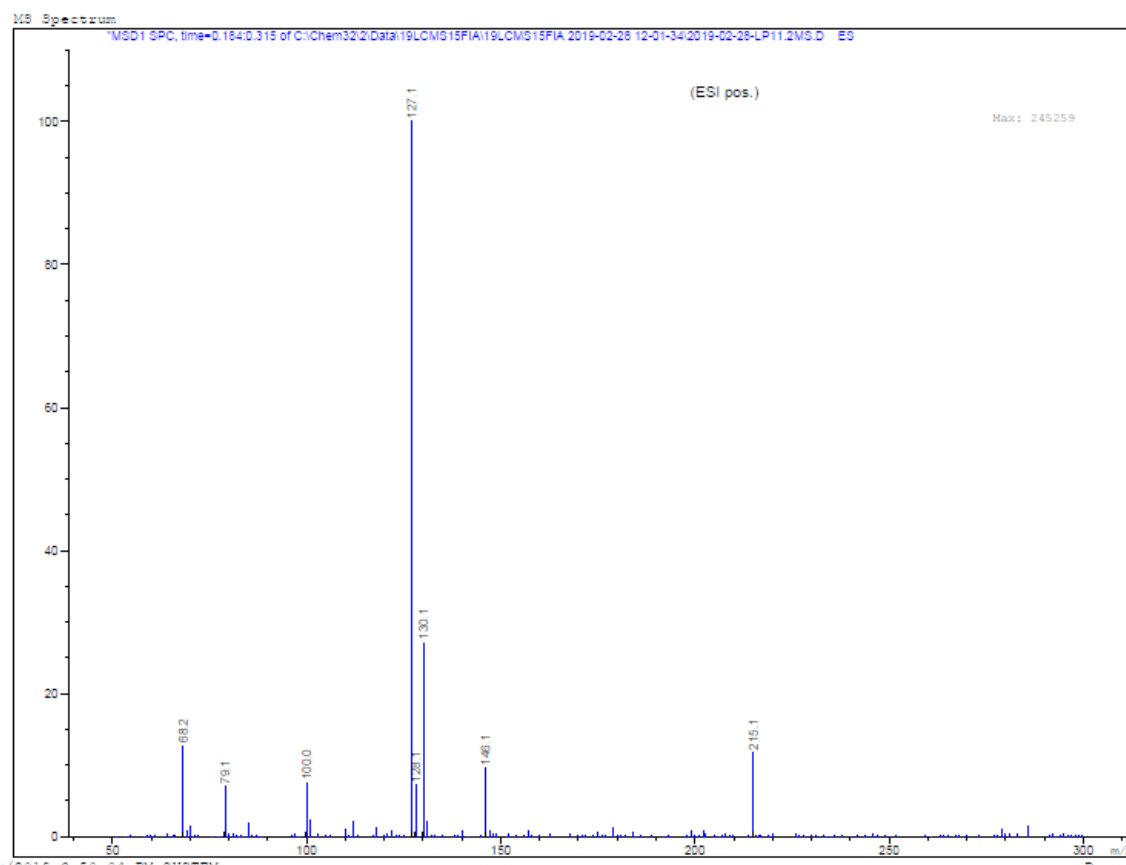


Figura A1 Espetro LC-MS da mistura de compostos obtida na reação de descarboxilação de *L*-arginina (**1**) com NBS.